

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 5 月 6 日 (06.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/038029 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/86, 5/10, 7/01 くば市 観音台 1 丁目 2 番 1 1 号 株式会社ディナ
ベック研究所内 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013476 (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビ
ル 6 階 Ibaraki (JP).
- (22) 国際出願日: 2003 年 10 月 22 日 (22.10.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-310053
2002 年 10 月 24 日 (24.10.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会
社ディナベック研究所 (DनावEC RESEARCH INC.)
[JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市 観音台 1 丁目
2 5 番 1 1 号 Ibaraki (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡野 慎士
(OKANO, Shinji) [JP/JP]; 〒812-0041 福岡県 福岡市
博多区吉塚 4 丁目 1 5-3-3 0 1 Fukuoka (JP). 米満
吉和 (YONEMITSU, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒813-0043 福
岡県 福岡市 東区名島 5-3-1-3 Fukuoka (JP). 居石
克夫 (SUEISHI, Katsuo) [JP/JP]; 〒815-0073 福岡県 福
岡市 南区大池 1-2 9-2 2 Fukuoka (JP). 長谷川 護
(HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つ
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF TRANSFERRING GENE INTO T CELLS

(54) 発明の名称: T細胞に遺伝子を導入する方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of transferring a gene into T cells which comprises the step of contacting a paramyxovirus vector with activated T cells. It is also intended to provide a method of producing T cells having a foreign gene transferred therein which comprises the step of contacting a paramyxovirus vector with activated T cells. Moreover, it is intended to provide T cells having a foreign gene transferred therein which are produced by the above method. Thus, a gene can be efficiently delivered specifically into activated T cells, which is expected as applicable to immunological modification strategies through T cell-directed gene delivery.

(57) 要約: 本発明は、パラミクソウイルスベクターと活性化したT細胞とを接触させる工程を含む、T細胞に遺伝子を導入する方法を提供する。また本発明は、外来遺伝子が導入されたT細胞の製造方法であって、パラミクソウイルスベクターと活性化したT細胞とを接触させる工程を含む方法を提供する。また本発明は、この方法により製造された、外来遺伝子が導入されたT細胞を提供する。本発明により、効率的な活性化T細胞特異的な遺伝子送達が可能となり、T細胞を指向した遺伝子送達による免疫学的な改変戦略への適用が期待される。

BEST AVAILABLE COPY

明細書

T細胞に遺伝子を導入する方法

技術分野

本発明は、T細胞に遺伝子を導入する方法に関する。

背景技術

造血細胞の遺伝的改変は、自己免疫疾患、免疫不全、さらには抗腫瘍免疫の活性化を介した腫瘍に対する治療の魅力的な戦略である。様々な血液細胞の中でもTリンパ球は、アデノシンデアミナーゼ (adenosine-deaminase ; ADA) 欠損症による重症複合型免疫不全 (ADA-SCID) に対する遺伝子治療の初期段階から遺伝子送達の標的の1つとされてきた (Blaese, R.M. et al., Science, 1995, 270: 475-480; Altenschmidt, U. et al., J. Mol. Med., 1997, 75: 259-266; Misaki, Y. et al., Mol. Ther., 2001, 3: 24-27)。しかしながら、レトロウイルスなどの現在使用可能なベクターによる遺伝子送達に対して、T細胞は比較的抵抗性を示すことが、現在の障壁となっている。

自己免疫疾患、移植後のアロ器官拒絶、または腫瘍などの治療における臨床場面を考えると、活性化Tリンパ球のサブセットは遺伝的改変の標的として理想的であるに違いない (Altenschmidt, U. et al., J. Mol. Med., 1997, 75: 259-266; Hege, K.M. and Roberts, M.R., Curr. Opin. Biotechnol., 1996, 7: 629-634; Tuohy, V.K. et al., J. Neuroimmunol., 2000, 107: 226-232)。遺伝子マーキングに関する初期の臨床報告により、腫瘍抗原により活性化される腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes; TILs) が、腫瘍を持つ個体内において腫瘍に移動することが実証されたことから、TILsは治療遺伝子を腫瘍へと移動させる理想的な担体ビークルであることが示唆される (Rosenberg, S.A. et al.,

N. Engl. J. Med., 1990, 323: 570-578)。活性化Tリンパ球の類似した特徴は、自己免疫および器官移植においても期待されるものの、その研究はここ10年ほとんどなされておらず、それは現在のベクターの活性化T細胞への遺伝子送達の効率が低いことが原因と予想される。

最近では、新しく登場したTリンパ球への遺伝子送達ベクター、すなわちヒト免疫不全ウイルス（HIV）をベースとするレンチウイルスベクターに多くの注目が集まっているが、これはHIVがCD4リンパ球に指向したトロピズムを持つからである。近年の努力の結果、ベクターゲノムの核へのインポートおよび染色体へのインテグレーションを促進するセントラルDNAフラップを構築することを介して、HIVの活性化T細胞への遺伝子送達効率は飛躍的に向上した（従来のHIVベクターでは平均15%に対して、このベクターでは平均51%）（Dardalhon, V. et al., Gene Ther., 2001, 8: 190-198）。しかしながら、特にHIVを含む病原性ウイルスをベースとしたレンチウイルスの場合には、潜在的な安全性に関する関心が臨床適用を遅らせている（Buchsacher, G.L. Jr. and Wong-Staal, F., Blood 2000, 95: 2499-2504）。より効率的に遺伝子送達が可能で、より安全な他の選択肢を開発する努力を続けることが必要であることは明らかである。

発明の開示

T細胞へ効率的に遺伝子導入が可能なベクターを探し出すため、T細胞に対して種々の条件でベクターの導入を行い、遺伝子導入効率を測定した。その結果、本発明者らは、パラミクソウイルスベクターが、抗原活性化T細胞に対して高い遺伝子導入効率を示すことを見いだした。遺伝子導入は活性化T細胞に特異的、すなわちベクターの遺伝子導入効率はナイーブT細胞と比べ活性化T細胞に対して顕著に高かった。パラミクソウイルスベクターは、抗原活性化T細胞への遺伝子導入のためのベクターとして好適に用いられる。

Tリンパ球を指向した遺伝子治療は、様々な免疫学的疾患に対する治療の可能性

を持っているが、これまでのT細胞の遺伝子治療においては、複雑な操作を行うにも関わらず遺伝子導入（ジーントランスダクション）の効率が低いことが大きな制約となっていた。本発明により、パラミクソウイルスベクターは、非常に単純な手順で、活性化T細胞に特異的に外来遺伝子を発現できることが実証され、T細胞の遺伝子治療における上記の問題を克服することが可能となった。本発明により、活性化T細胞特異的な遺伝子送達を効率的に実施することが可能となり、免疫疾患におけるT細胞を指向した遺伝子送達による改変戦略への適用が期待される。

すなわち本発明は、T細胞に遺伝子を導入する方法に関し、より具体的には、

- (1) T細胞に遺伝子を導入する方法であって、該遺伝子を保持するパラミクソウイルスベクターと活性化したT細胞とを接触させる工程を含む方法、
- (2) パラミクソウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、(1)に記載の方法、
- (3) 外来遺伝子が導入されたT細胞の製造方法であって、該遺伝子を保持するパラミクソウイルスベクターと活性化したT細胞とを接触させる工程を含む方法、
- (4) パラミクソウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、(3)に記載の方法、
- (5) (3) または (4) に記載の方法により製造された、外来遺伝子が導入されたT細胞、
- (6) 活性化T細胞への遺伝子送達のために用いる、パラミクソウイルスベクター、
- (7) パラミクソウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、(6)に記載のベクター、に関する。

本発明は、パラミクソウイルスベクターを用いるT細胞への遺伝子導入方法を提供する。この方法は、導入したい遺伝子を保持するパラミクソウイルスベクターを、活性化したT細胞に接触させる工程を含む方法である。本発明者等は、パラミ

クソウイルスベクターが極めて高い効率で活性化T細胞へ遺伝子を導入できることを見出した。ナイーブT細胞に対しては、パラミクソウイルスベクターによる遺伝子導入効率は低く、このベクターによる遺伝子導入は、抗原活性化T細胞に特異的であることが判明した。従って、本発明の方法は、活性化T細胞への選択的な遺伝子導入に好適に利用することができる。T細胞は、癌およびその他の疾患の治療において免疫系を制御するための標的として重要であり、本発明の方法はこれら疾患の遺伝子治療に好適に用いられ得る。遺伝子導入は培養液、生理食塩水、血液、体液など所望の生理的水溶液中で行うことができる。

また本発明は、T細胞に所望の遺伝子を導入する方法であって、(a) 該T細胞を活性化させる工程、および(b) 該遺伝子を保持するパラミクソウイルスベクターを、活性化させたT細胞に接触させる工程、を含む方法を提供する。この方法も、本発明におけるT細胞に遺伝子を導入する方法に含まれる。T細胞は、抗原刺激により活性化することができる。T細胞を活性化させる工程は、パラミクソウイルスベクターによる効率的な遺伝子導入を可能にする。T細胞の活性化は、パラミクソウイルスベクターをこのT細胞に接触させる前に行ってもよいし、パラミクソウイルスベクターの存在下で行ってもよい。

単純な技術により高い効率で遺伝子送達が起こることは、パラミクソウイルスベクターを介したT細胞標的化遺伝子送達の重要な優位性の1つである。以前に報告されているように、レトロウイルスおよびレンチウイルスを介したT細胞への遺伝子送達は、最適な遺伝子送達のためには遠心で濃縮しなくてはならず、毒性のある薬剤であるポリブレンなどを必要とする(Bunnell, B.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1995, 92: 7739-7743; Chuck, A.S., Hum. Gene Ther., 1996, 7: 743-750; Chinnasamy, D. et al., Blood 2000, 96: 1309-1316; Fehse, B. et al., Br. J. Haematol., 1998, 102: 566-574)。一方でパラミクソウイルスベクター溶液は特別な薬剤に助けられることなく、単に添加するだけでより優れた遺伝子送達を達成することができた。さらに、活性化T細胞へ

のセンドライウイルスベクター (SeV) を介する最適な遺伝子送達は、鼻腔粘膜 (nasal mucosa) (Yonemitsu, Y. et al., Nat. Biotechnol., 2000, 18: 970-973)、血管 (vasculature) (Masaki, I. et al., FASEB J., 2001, 15: 1294-1296)、網膜組織 (retinal tissue) (Ikeda, Y. et al., Exp. Eye Res., 2002, 75: 39-48) 等で見られた代表的な結果と同様、比較的短い暴露で行うことができた (30分未満、データ省略)。臨床場面を考えると、パラミクソウイルスベクターを介した遺伝子送達のこれらの特徴は、本発明においても、Tリンパ球の *ex vivo* での遺伝的改変を単純化し、操作に依存した細胞生存性の喪失を最小化し得るものである。

本発明者らは、*in vitro* でヒトリンパ球の細胞濃度を低くするほど、遺伝子導入細胞の比率が低くなることを見いだしたが、この結果はマウス細胞でも見られた。従って、遺伝子導入においては、細胞濃度は比較的高いことが好ましい。細胞濃度は、例えば $1 \times 10^6/\text{ml} \sim 4 \times 10^6/\text{ml}$ 、好ましくは $4 \times 10^6/\text{ml} \sim 8 \times 10^6/\text{ml}$ 、好ましくは $8 \times 10^6/\text{ml} \sim 1 \times 10^7/\text{ml}$ 程度にするとよい。

MOIは1～500の間で投与することが好ましく、より好ましくは2～300、さらに好ましくは3～200である。ベクターとT細胞との接触は短い時間でも十分であり、例えば1分以上、好ましくは3分以上、5分以上、10分以上、または20分以上接触させればよく、例えば1～60分程度、より特定すれば5分～30分程度であってよい。もちろん、それ以上の時間接触させてもよく、例えば数日間またはそれ以上接触させてもよい。

最近、免疫学的シナプス (immunological synaps) を用いて抗CD3、抗CD28、および4-1BBリガンドによりT細胞を刺激できるユニバーサルアーティフィシャル抗原提示細胞 (APC) システム (Maus, M. V. et al., Nat. Biotechnol., 2002, 20: 143-148) を含む、幾つかの洗練された効率的な技術により、十分な量のT細胞株をより容易に調製することが可能となった。そのような技術を組み合わせれば、SeVに由来するベクター系は、様々な免疫学的疾患に対するT細胞指向性の遺伝子

治療の臨床適用のための重要な治療的可能性を持つ。

また本発明は、活性化T細胞に選択的に遺伝子を導入する方法であって、該遺伝子を保持するパラミクソウイルスベクターを、活性化T細胞およびナイーブT細胞を含む細胞集団中に共存させる工程を含む方法を提供する。活性化T細胞に選択的とは、ナイーブT細胞に比べ活性化T細胞へ有意に遺伝子が導入されることを言う。例えば本発明は、該遺伝子を保持するパラミクソウイルスベクターを、活性化T細胞およびナイーブT細胞を含む細胞集団中に添加する工程を含む方法を提供する。パラミクソウイルスベクターは、ナイーブT細胞に比べ活性化T細胞へ優先的に遺伝子を導入するので、この方法により活性化T細胞に選択的に遺伝子を導入することができる。あるいは、予めT細胞とベクターを共存させておき、その後このT細胞を活性化させる処理を行うことにより、活性化されたT細胞の選択的にベクターを導入することができる。これらの方法も、本発明におけるT細胞に遺伝子を導入する方法に含まれる。

T細胞はTリンパ球ともいい、組織主要適合抗原 (Major Histocompatibility Complex; MHC) 上にのった抗原のペプチド複合体を認識するレセプターであるT細胞レセプターを発現したリンパ球である。主として、骨髄の幹細胞より分化し、胸腺にてポジティブセレクション (自己のMHCを認識できるレパーターの選択)、ネガティブセレクション (自己抗原を認識するレパーター排除) を受け、成熟ナイーブT細胞として末梢血液、及びリンパ組織に出現する。T細胞は蛋白抗原、腫瘍抗原、アロ抗原、病原体などから由来するペプチドを認識し、抗原特異的な個体の免疫応答 (適応免疫) を発生させる主たるリンパ球であり、ペプチドに対する抗体産生を援助 (液性免疫)、あるいはそれ自身が武装化T細胞となって細胞性免疫を発動する。

活性化T細胞とは、抗原またはマイトジェンなどの刺激により、増殖分化へと導かれる状態となったTリンパ球を言う。つまり、T細胞レセプターの結合、あるいは直接的な酵素活性化により細胞内チロシンリン酸化酵素の活性化、これに続く

イノシトールリン脂質代謝の亢進、細胞内カルシウム濃度の上昇を経て、インターロイキン(IL)-2産生、IL-2レセプターの発現、及びそれに伴う細胞シグナルにより、DNA合成、細胞分裂を開始し、増殖分化しているT細胞を言う。活性化時の生体環境により種々のサイトカインを産生する種々のT細胞へと分化する。

また、本発明において活性化T細胞は、好ましくは抗原により活性化されたT細胞である。センダイウイルスベクターによる導入は抗原活性化T細胞に選択的であり、抗原非特異的T細胞には、*ex vivo*において抗原に応答した特異的T細胞からバイズタンダーに活性化される場合においては遺伝子導入効率は低い。従って、T細胞を抗原により活性化することにより、あるいはこれと同等の活性化を行うことにより、ベクターによる遺伝子導入効率を劇的に向上させることができる。

抗原活性化T細胞とは、先に述べた抗原提示細胞のMHCと、ある特定の抗原由来のペプチドなどとの複合体と適切なアフィニティーのあるT細胞レセプターを持ったT細胞が、両者の結合を介して、活性化シグナルを伝達したT細胞を言い、好ましくは、CD28、4-1BB等の適切なコレセプターよりのシグナルを伝達する事によって活性化したT細胞である。抗原活性化T細胞は、好ましくは、増殖、芽球化、IL-2、IL-4、IFN- γ などの各種サイトカイン産生、Fas Ligand、perforinなどの細胞傷害分子発現、及びCD40 Ligand等の抗原提示細胞および/またはB細胞を活性化するなどの能力を有する。抗原特異的T細胞はリンパ節等ではMHCとペプチドを提示した抗原提示細胞のもとで、抗原提示細胞の活性化および/またはB細胞の活性化、抗体産生刺激を行い、末梢組織の局所ではその産生サイトカインおよび細胞傷害分子による細胞傷害、炎症の促進などの作用により、生体から非自己蛋白、非自己細胞、病原体の排除に主要な作用を及ぼす。

活性化T細胞は、分画により調製することができる。例えばヒトT細胞は、活性化に伴いCD抗原の表現パターンを変化させるという特徴があるため、これにより活性化T細胞とナイーブT細胞とを選別することが可能である。具体的方法として、T細胞をネガティブセレクションで採取し、活性化T細胞に表出するCD45ROに対

する抗体を用い、マグネットビーズ分離法あるいはflow cytometryによるソーティングを行うことで、好ましくは、CD45RA及び、CD62LダブルポジティブT細胞はナイーブT細胞、それ以外は活性化あるいはメモリーT細胞と考えられていることから、両者に対する抗体を用いて、マグネットビーズ分離法あるいはflow cytometryによるソーティングを行うことで、活性化T細胞あるいはナイーブT細胞を分画できる。分画に用いる抗体は、既知の活性化関連マーカーを組み合わせたすべての方法で可能である。また、ケモカインレセプター、サイトカインレセプターなどの活性化T細胞の中のある特殊な機能をもったポピュレーションを分画する方法も含まれる。分画法に関しては、その他、比重を用いた方法など、既存の方法を含む。

また活性化T細胞は、ナイーブT細胞を抗原刺激により活性化して調製することもできる。例えばナイーブT細胞は、抗CD3抗体（ $10\mu\text{g/ml}$ ）と抗CD28抗体（ $10\mu\text{g/ml}$ ）を固着させたプレートに以下に述べる濃度で培養することで、好ましくは末梢血単球より分化させた成熟樹状細胞を同時に添加することで活性化させることができる。また、腫瘍抗原による活性化の項で述べるように、樹状細胞とペプチド、あるいは蛋白抗原を添加された培養でも活性化させることができる。

抗原活性化T細胞の調製は、例えばヒトアロ抗原を用いる場合は、ドナー、レシピエント末梢血を採取し、それぞれを末梢血リンパ球分離液でリンパ球を分離し、それぞれ $1\times 10^7/\text{ml}$ の濃度に調整、ドナー由来の細胞浮遊液を30 Gyの放射線照射を行い、24穴のプレートに各穴にそれぞれ $500\mu\text{l}$ ずつ注入し、ヒトIL-2（5～100 U/ml）で約7日間培養することで得られる。継代は約7日間ごとのドナー放射線照射リンパ球で再刺激することで可能である。抗原特異的T細胞株としては、少なくとも3回の抗原刺激（初回を含め、）を受けたものが望ましい。あるいは、2回の抗原刺激以降は抗CD3抗体と抗CD28抗体が固着化されたビーズあるいは細胞などを用いて刺激、増殖させたものも、抗原活性化T細胞に含まれる。

腫瘍抗原などによる活性化の場合は、4回以上の迅速な凍結融解をくり返して腫

瘍細胞を溶解した溶液を末梢血より分化させた樹状細胞に添加した後、放射線照射20 Gy～30 Gyを照射したものを抗原提示細胞とし、それに末梢血より分離したT細胞をIL-2 (5～100 U/ml) 単独あるいは、その他IL-7等の至適サイトカインの存在下で7日間共培養、7日ごとの再刺激を3回行うことによって得られる (Fields, R. C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 9482-9487)。ここで用いられる樹状細胞は、末梢血単球あるいは骨髓、臍帯血、動化末梢血などの造血幹細胞よりGM-CSF、IL-4等のサイトカインを用いて増殖分化させる既知の方法により得られたものすべてを含む。

末梢血のT細胞の分離は、T細胞分離液での分離でも良いし、抗原内の有効なペプチドが分かっているならば、Class I あるいはClass II のテトラマーとペプチド複合体による抗原特異的T細胞の分離方法により得られたものであってもよい。

活性化T細胞の調製に関して、以上の他に、既知の特異的抗原が明らかなものに関して、その抗原あるいは抗原由来の蛋白、ペプチドを使用して、T細胞を活性化する方法により調製することもできる。その他、活性化T細胞の作成には、レクチン等を用いた非特異的な活性化方法など、既知のT細胞活性化方法が使用可能である。本発明において抗原活性化T細胞には、このようにして得られた細胞も含まれる。

これら活性化されたT細胞は、適切な増殖因子、サイトカインと抗原及び抗原提示細胞（フィーダー細胞、分化させた樹状細胞、アーティフィシャルAPCなどを含む）での共培養、または、抗原のない抗原提示細胞などとの共培養で継代が可能である。その他、種々の治療対象疾患にあった継代法を用いてもよい。例えば、感染免疫等に対する移入免疫治療の場合は、抗原で活性化されている最中のT細胞は様々なサイトカインを産生しているため、生体内へ移入した際、発熱等の副作用があらわれる可能性が有る。また、移入免疫としてのT細胞は生体の感染時のみその機能を発現すべきである。そのため、抗原で活性化したT細胞にパラミクソウイルスベクターを用いて遺伝子導入した後、一旦、抗原のない状態でAPCと共培

養で継代し、静止状態の活性化T細胞（いわゆるメモリーT細胞）を継代によって作成する方法等がある。

本発明においてパラミクソウイルスベクターとは、パラミクソウイルスをベースとする感染力を持つウイルス粒子であって、遺伝子を細胞に導入するための担体である。ここで「感染力」とは、パラミクソウイルスベクターが細胞への接着能を保持しており、接着した細胞の内部にベクターに含まれる遺伝子を導入することのできる能力のことを言う。好ましい態様では、本発明のパラミクソウイルスベクターは、ベクターのゲノムRNA中に外来遺伝子が発現できるように組み込まれている。本発明のパラミクソウイルスベクターは、複製能を有していてもよく、複製能を有さない欠損型ベクターであってもよい。「複製能を有する」とは、ウイルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。

組み換えウイルスとは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成したウイルスを言う。組み換えポリヌクレオチドとは、両端または片端が自然の状態と同じようには結合していないポリヌクレオチドを言う。具体的には、組み換えポリヌクレオチドは、人の手によってポリヌクレオチド鎖の結合が改変（切断および/または結合）されたポリヌクレオチドである。組み換えポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド合成、ヌクレアーゼ処理、リガーゼ処理等を組み合わせて、公知の遺伝子組み換え方法により生成させることができる。組み換えウイルスは、遺伝子操作により構築されたウイルスゲノムをコードするポリヌクレオチドを発現させ、ウイルスを再構築することによって生成することができる。例えば、組換えパラミクソウイルスは、cDNAから再構成して生成することができる（Y. Nagai, A. Kato, Microbiol. Immunol., 43, 613-624 (1999)）。

本発明において遺伝子とは遺伝物質を指し、転写単位をコードする核酸を言う。遺伝子はRNAであってもDNAであってもよい。本発明において蛋白質をコードする核酸は、該蛋白質の遺伝子と呼ぶ。また遺伝子は蛋白質をコードしていなくて

もよく、例えば遺伝子はリボザイムまたはアンチセンスRNAなどの機能的RNAをコードするものであってもよい。遺伝子は天然由来または人為的に設計された配列であり得る。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAを含む。また蛋白質をコードするとは、ポリヌクレオチドが該蛋白質を適当な条件下で発現できるように、該蛋白質のアミノ酸配列をコードするORFをセンスまたはアンチセンスに含むことを言う。

本発明においてパラミクソウイルスとはパラミクソウイルス科 (*Paramyxoviridae*) に属するウイルスまたはその誘導体を指す。パラミクソウイルスは、非分節型ネガティブ鎖RNAをゲノムに持つウイルスのグループの1つで、パラミクソウイルス亜科 (*Paramyxovirinae*) (レスピロウイルス属 (パラミクソウイルス属とも言う)、ルブラウイルス属、およびモービリウイルス属を含む) およびニューモウイルス亜科 (*Pneumovirinae*) (ニューモウイルス属およびメタニューモウイルス属を含む) ウイルスを含む。本発明を適用可能なパラミクソウイルスとしては、具体的にはセンダイウイルス (Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス (Mumps virus)、麻疹ウイルス (Measles virus)、RSウイルス (Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス (rinderpest virus)、ジステンパーウイルス (distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1, 2, 3型等が挙げられる。より具体的には、例えば Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin molbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、Nipah virus (Nipah)、human parainfluenza virus-2 (HPIV-2)、simian parainfluenza virus 5 (SV5)、human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a)、human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b)、mumps virus (Mumps)、およびNewcastle disease virus

(NDV) などが含まれる。より好ましくは、Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin morbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PPRV)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、および Nipah virus (Nipah) からなる群より選択されるウイルスが例示できる。本発明のウイルスは、好ましくはパラミクソウイルス亜科（レスピロウイルス属、ルブラウイルス属、およびモービリウイルス属を含む）に属するウイルスまたはその誘導体であり、より好ましくはレスピロウイルス属（genus *Respirovirus*）（パラミクソウイルス属（*Paramyxovirus*）とも言う）に属するウイルスまたはその誘導体である。本発明を適用可能なレスピロウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス1型（HPIV-1）、ヒトパラインフルエンザウイルス3型（HPIV-3）、ウシパラインフルエンザウイルス3型（BPIV-3）、センダイウイルス（Sendai virus；マウスパラインフルエンザウイルス1型とも呼ばれる）、およびサルパラインフルエンザウイルス10型（SPIV-10）などが含まれる。本発明においてパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などに由来してもよい。

パラミクソウイルスベクターはゲノムRNAに搭載遺伝子をアンチセンスにコードしている。ゲノムRNAとは、パラミクソウイルスのウイルス蛋白質と共にリボヌクレオプロテイン（RNP）を形成し、該蛋白質によりゲノム中の遺伝子が発現し、このRNAが複製されて娘RNPが形成される機能を持つRNAである。一般にパラミクソウイルスのゲノムは、3' リーダー領域と5' トレイラー領域の間に、ウイルス遺伝子がアンチセンスとして並んだ構成をしている。各遺伝子のORFの間には、転写終結配列（E配列） - 介在配列（I配列） - 転写開始配列（S配列）が存在し、これにより各遺伝子のORFをコードするRNAが別々のシストロンとして転写される。

パラミクソウイルスのウイルスタンパク質をコードする遺伝子としては、NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子が含まれる。「NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子」とは、それぞれヌクレオキャプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ、およびラージ蛋白質をコードする遺伝子のことを指す。パラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、NP遺伝子は「N遺伝子」と表記されることもある。

レスピロウイルス属	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
ルブラウイルス属	NP	P/V	M	F	HN (SH)		L
モービリウイルス属	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

例えばセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP遺伝子については M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218、P遺伝子については M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008、M遺伝子については D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056、F遺伝子については D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、M69046、X00152、X02131、HN遺伝子については D26475、M12397、M30202、M30203、M30204、M69046、X00586、X02808、X56131、L遺伝子については D00053、M30202、M30203、M30204、M69040、X00587、X58886を参照のこと。またその他のウイルスがコードするウイルス遺伝子を例示すれば、N遺伝子については、CDV、AF014953；DMV、X75961；HPIV-1、D01070；HPIV-2、M55320；HPIV-3、D10025；Mapuera、X85128；Mumps、D86172；MV、K01711；NDV、AF064091；PDPR、X74443；PDV、X75717；RPV、X68311；SeV、X00087；SV5、M81442；および Tupaia、AF079780、P遺伝子については、CDV、X51869；DMV、Z47758；HPIV-1、M74081；HPIV-3、X04721；HPIV-4a、M55975；HPIV-4b、M55976；Mumps、D86173；MV、M89920；NDV、M20302；PDV、X75960；RPV、X68311；SeV、M30202；SV5、AF052755；および Tupaia、AF079780

、C遺伝子については CDV, AF014953; DMV, Z47758; HPIV-1. M74081; HPIV-3, D00047; MV, AB016162; RPV, X68311; SeV, AB005796; および Tupaia, AF079780
、M遺伝子については CDV, M12669; DMV Z30087; HPIV-1, S38067; HPIV-2, M62734; HPIV-3, D00130; HPIV-4a, D10241; HPIV-4b, D10242; Mumps, D86171; MV, AB012948; NDV, AF089819; PDPR, Z47977; PDV, X75717; RPV, M34018; SeV, U31956; および SV5, M32248、F遺伝子については CDV, M21849; DMV, AJ224704; HPN-1. M22347; HPIV-2, M60182; HPIV-3. X05303, HPIV-4a, D49821; HPIV-4b, D49822; Mumps, D86169; MV, AB003178; NDV, AF048763; PDPR, Z37017; PDV, AJ224706; RPV, M21514; SeV, D17334; および SV5, AB021962、HN (HまたはG) 遺伝子については CDV, AF112189; DMV, AJ224705; HPIV-1, U709498; HPIV-2. D000865; HPIV-3, AB012132; HPIV-4A, M34033; HPIV-4B, AB006954; Mumps, X99040; MV, K01711; NDV, AF204872; PDPR, Z81358; PDV, Z36979; RPV, AF132934; SeV, U06433; および SV-5, S76876 が例示できる。但し、各ウイルスは複数の株が知られており、株の違いにより上記に例示した以外の配列からなる遺伝子も存在する。

これらのウイルス蛋白質をコードするORFおよび外来遺伝子のORFは、ゲノムRNAにおいて上記のE-I-S配列を介してアンチセンスに配置される。ゲノムRNAにおいて最も3'に近いORFは、3' リーダー領域と該ORFとの間にS配列のみが必要であり、EおよびI配列は必要ない。またゲノムRNAにおいて最も5'に近いORFは、5' トレイラー領域と該ORFとの間にE配列のみが必要であり、IおよびS配列は必要ない。また2つのORFは、例えばIRES等の配列を用いて同一シストロンとして転写させることも可能である。このような場合は、これら2つのORFの間にはE-I-S配列は必要ない。野生型のパラミクソウイルスの場合、典型的なRNAゲノムは、3' リーダー領域に続き、N、P、M、F、HN、およびL蛋白質をアンチセンスにコードする6つのORFが順に並んでおり、それに続いて5' トレイラー領域を他端に有する。本発明のゲノムRNAにおいては、ウイルス遺伝子の配置はこれに限定されるものではないが、

好ましくは、野生型ウイルスと同様に、3' リーダー領域に続き、N、P、M、F、HN、およびL蛋白質をコードするORFが順に並び、それに続いて5' トレイラー領域が配置されることが好ましい。ある種のパラミクソウイルスにおいては、ウイルス遺伝子が異なっているが、そのような場合でも上記と同様に各ウイルス遺伝子を野生型と同様の配置とすることが好ましい。一般に N、P、およびL遺伝子を保持しているベクターは、細胞内で自律的にRNAゲノムから遺伝子が発現し、ゲノムRNAが複製される。さらにFおよびHN遺伝子等のエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子、およびM遺伝子の働きにより、感染性のウイルス粒子が形成され、細胞外に放出される。従って、このようなベクターは複製能を有するウイルスベクターとなる。T細胞に導入したい外来遺伝子は、後述するように、このゲノム中の蛋白質非コード領域に挿入すればよい。

また、本発明のパラミクソウイルスベクターは、野生型パラミクソウイルスが持つ遺伝子のいずれかを欠損したものであってよい。例えば、M、F、またはHN遺伝子、あるいはそれらの組み合わせが含まれていないパラミクソウイルスベクターも、本発明のパラミクソウイルスベクターとして好適に用いることができる。このようなウイルスベクターの再構成は、例えば、欠損している遺伝子産物を外来的に供給することにより行うことができる。このようにして製造されたウイルスベクターは、野生型ウイルスと同様に宿主細胞に接着して細胞融合を起こすが、細胞に導入されたベクターゲノムはウイルス遺伝子に欠損を有するため、最初と同じような感染力を持つ娘ウイルス粒子は形成されない。このため、一回限りの遺伝子導入力を持つ安全なウイルスベクターとして有用である。ゲノムから欠損させる遺伝子としては、例えばF遺伝子および／またはHN遺伝子が挙げられる。例えば、F遺伝子が欠損した組み換えパラミクソウイルスベクターゲノムを発現するプラスミドを、F蛋白質の発現ベクターならびにNP、P、およびL蛋白質の発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、ウイルスベクターの再構成を行うことができる (W000/70055 および W000/70070; Li, H.-O. et

al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000))。また、例えば、F遺伝子が染色体に組み込まれた宿主細胞を用いてウイルスを製造することもできる。これらの蛋白質群は、そのアミノ酸配列はウイルス由来の配列そのままでも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、本発明のウイルスベクターとして、ベクターゲノムが由来するウイルスのエンベロープ蛋白質とは異なる蛋白質をエンベロープに含むベクターを作製することもできる。例えば、ウイルス再構成の際に、ベクターのベースとなるウイルスのゲノムがコードするエンベロープ蛋白質以外のエンベロープ蛋白質を細胞で発現させることにより、所望のエンベロープ蛋白質を有するウイルスベクターを製造することができる。このような蛋白質に特に制限はない。例えば、他のウイルスのエンベロープ蛋白質、例えば水疱性口内炎ウイルス (VSV) のG蛋白質 (VSV-G) を挙げることができる。本発明のウイルスベクターには、VSV-G蛋白質などのように、ゲノムが由来するウイルス以外のウイルスに由来するエンベロープ蛋白質を含むシュードタイプウイルスベクターが含まれる。ウイルスのゲノムRNAにはこれらのエンベロープ蛋白質をゲノムにコードされないように設計すれば、ウイルス粒子が細胞に感染した後は、ウイルスベクターからこの蛋白質が発現されることはない。

また、本発明のウイルスベクターは、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質、抗体またはその断片、あるいはこれらの蛋白質を細胞外領域に有し、ウイルスエンベロープ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラ蛋白質などを含むものであってもよい。これにより、ベクターのT細胞への特異性を制御し得る。これらはウイルスゲノムにコードされていてもよいし、ウイルスベクターの再構成時に、ウイルスゲノム以外の遺伝子 (例えば別の発現ベクターまたは宿主染色体上などにある遺伝子) の発現により供給されてもよい。

また本発明のベクターは、例えばウイルス蛋白質による免疫原性を低下させるために、またはRNAの転写効率または複製効率を高めるために、ベクターに含まれる任意のウイルス遺伝子が野生型遺伝子から改変されていてよい。具体的には、例えばパラミクソウイルスベクターにおいては、複製因子であるN、P、およびL遺伝子の中の少なくとも一つを改変し、転写または複製の機能を高めることが考えられる。また、エンベロープ蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン (hemagglutinin) 活性とノイラミニダーゼ (neuraminidase) 活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、F蛋白質を改変することにより膜融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質またはHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用してこれらの蛋白質に関する抗原提示能を弱めたウイルスベクターを作製することもできる。

また本発明のベクターにおいては、アクセサリー遺伝子が欠損したものであってよい。例えばSeVのアクセサリー遺伝子の1つであるV遺伝子をノックアウトすることにより、培養細胞における遺伝子発現および複製は障害されることなく、マウス等の宿主に対するSeVの病原性が顕著に減少する (Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71:7266-7272; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587; Curran, J. et al., WO01/04272, EP1067179)。このような弱毒化ベクターは、*in vivo* または*ex vivo*における毒性のない遺伝子導入用ウイルスベクターとして特に有用である。

パラミクソウイルスは遺伝子導入ベクターとして優れており、宿主細胞の細胞質でのみ転写・複製を行い、DNAフェーズを持たないため染色体への組み込み (integration) は起こらない (Lamb, R.A. and Kolakofsky, D., Paramyxoviridae : The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM,

(eds). Fields of virology. Vol. 2. Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, 1996, pp. 1177-1204)。このため染色体異常による癌化および不死化などの安全面における問題が生じない。パラミクソウイルスのこの特徴は、ベクター化した時の安全性に大きく寄与している。異種遺伝子発現の結果では、例えばセンダイウイルス (SeV) を連続多代継代しても殆ど塩基の変異が認められず、ゲノムの安定性が高く、挿入異種遺伝子を長期間に渡って安定に発現する事が示されている (Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466 (1997))。また、カプシド構造蛋白質を持たないことによる導入遺伝子のサイズまたはパッケージングの柔軟性 (flexibility) など性質上のメリットがある。このように、パラミクソウイルスベクターは、ヒトの遺伝子治療のための高効率ベクターの新しいクラスとなることが示唆される。複製能を有するSeVベクターは、外来遺伝子を少なくとも4kbまで導入可能であり、転写ユニットを付加することによって2種類以上の遺伝子を同時に発現する事も可能である。

またセンダイウイルスは、齧歯類にとっては病原性で肺炎を生じることが知られているが、人に対しては病原性がない。これはまた、野生型センダイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト霊長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によっても支持されている (Hurwitz, J.L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997)。センダイウイルスのこれらの特徴は、センダイウイルスベクターが、ヒトの治療へ応用できることを示唆し、センダイウイルスベクターが、ヒトT細胞を標的とした遺伝子治療の有望な選択肢の一つとなることを結論づけるものである。

本発明のウイルスベクターは、ゲノムRNA中に外来遺伝子をコードし得る。外来遺伝子を含む組換えパラミクソウイルスベクターは、上記のパラミクソウイルスベクターゲノムに外来遺伝子を挿入することによって得られる。外来遺伝子としては、標的とするT細胞において発現させたい所望の遺伝子を用いることができる。外来遺伝子は天然型蛋白質をコードする遺伝子であってもよく、あるいは欠失

、置換または挿入により天然型蛋白質を改変した蛋白質をコードする遺伝子であってもよい。外来遺伝子の挿入位置は、例えばウイルスゲノムの蛋白質非コード領域の所望の部位を選択することができ、例えばゲノムRNAの3' リーダー領域と3' 端に最も近いウイルス蛋白質ORFとの間、各ウイルス蛋白質ORFの間、および/または5' 端に最も近いウイルス蛋白質ORFと5' トレイラー領域の間に挿入することができる。また、FまたはHN遺伝子などを欠失するゲノムでは、その欠失領域に外来遺伝子をコードする核酸を挿入することができる。パラミクソウイルスに外来遺伝子を導入する場合は、ゲノムへの挿入断片のポリヌクレオチドの鎖長が6の倍数となるように挿入することが望ましい (Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 4822-4830, 1993)。挿入した外来遺伝子とウイルスORFの間には、E-I-S配列が構成されるようにする。E-I-S配列を介して2またはそれ以上の遺伝子をタンデムに並べて挿入することができる。

ベクターに搭載する外来遺伝子の発現レベルは、その遺伝子上流（ネガティブ鎖の3' 側）に付加する転写開始配列の種類により調節することができる (W001/18223)。また、ゲノム上の外来遺伝子の挿入位置によって制御することができ、ネガティブ鎖の3' の近くに挿入するほど発現レベルが高く、5' の近くに挿入するほど発現レベルが低くなる。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウイルス蛋白質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。一般に、外来遺伝子の高い発現が得られることが有利と考えられるため、外来遺伝子は、効率の高い転写開始配列に連結し、ネガティブ鎖ゲノムの3' 端近くに挿入することが好ましい。具体的には、3' リーダー領域と3' に最も近いウイルス蛋白質ORFとの間に挿入される。あるいは、3' に一番近いウイルス遺伝子と2番目の遺伝子のORFの間に挿入してもよい。野生型パラミクソウイルスにおいては、ゲノムの3' に最も近いウイルス蛋白質遺伝子はN遺伝子であり、2番目の遺伝子はP遺伝子である。逆に、導入遺伝子の高発現が望ましくない場合は、例えばベクターにおける外来遺伝

子の挿入位置をネガティブ鎖のなるべく5'側に設定したり、転写開始配列を効率の低いものにするなどして、ウイルスベクターからの発現レベルを低く抑えることで適切な効果が得られるようにすることも可能である。

本発明のベクターを製造するには、哺乳動物細胞においてパラミクソウイルスの成分であるRNPの再構成に必要なウイルス蛋白質、すなわちN、P、およびL蛋白質の存在下、パラミクソウイルスのゲノムRNAをコードするcDNAを転写させる。転写によりネガティブ鎖ゲノム（すなわちウイルスゲノムと同じアンチセンス鎖）を生成させてもよく、あるいはポジティブ鎖（ウイルス蛋白質をコードするセンス鎖）を生成させても、ウイルスRNPを再構成することができる。ベクターの再構成効率を高めるには、好ましくはポジティブ鎖を生成させる。RNA末端は、天然のウイルスゲノムと同様に3'リーダー配列と5'トレイラー配列の末端をなるべく正確に反映させることが好ましい。転写産物の5'端を正確に制御するためには、例えば転写開始部位としてT7 RNAポリメラーゼ認識配列を利用し、該RNAポリメラーゼを細胞内で発現させればよい。転写産物の3'端を制御するには、例えば転写産物の3'端に自己切断型リボザイムをコードさせておき、このリボザイムにより正確に3'端が切り出されるようにすることができる（Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466）。

例えば外来遺伝子を有する組み換えセンダイウイルスベクターは、Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載等に準じて、次のようにして構築することができる。

まず、目的の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25ng/ μ l以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、*Not* I部位を利用してウイルスゲノムRNAをコードするDNAに外来遺伝子を挿入する場合を例にとって説明する。目的とするcDNA塩基配列の中に*Not* I認

識部位が含まれる場合は、部位特異的変異導入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、*Not* I部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から目的の遺伝子断片をPCRにより増幅し回収する。2つのプライマーの5'部分に*Not* I部位を付加しておくことにより、増幅された断片の両端を*Not* I部位とする。ウイルスゲノム上に挿入された後の外来遺伝子のORFとその両側のウイルス遺伝子のORFとの間にE-I-S配列が配置されるように、プライマー中にE-I-S配列を含めるように設計する。

例えば、フォワード側合成DNA配列は、*Not* Iによる切断を保証するために5'側に任意の2以上のヌクレオチド（好ましくはGCGおよびGCCなどの*Not* I認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT）を選択し、その3'側に*Not* I認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側にスペーサー配列として任意の9塩基または9に6の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその3'側に所望のcDNAの開始コドンATGからこれを含めてORFの約25塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基はGまたはCとなるように該所望のcDNAから約25塩基を選択してフォワード側合成オリゴDNAの3'の末端とすることが好ましい。

リバーズ側合成DNA配列は5'側から任意の2以上のヌクレオチド（好ましくはGCGおよびGCCなどの*Not* I認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT）を選択し、その3'側に*Not* I認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さは、最終的なPCR増幅産物の*Not* I断片の鎖長が6の倍数になるように塩基数を設計する（いわゆる「6のルール（rule of six）」；Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67: 4822-4830, 1993）。このプライマーにE-I-S配列を付加する場合には、挿入断片のオリゴDNAの3'側にセンダイウイルスのS配列、I配列、およびE配列の相補鎖配列、好ましくはそれぞれ5'-CTTTCACCCT-3'（配列番号：1）、5'-AAG-3'、および5'-TTTTCTTACTACGG-3'（

配列番号：2）を付加し、さらにその3'側に所望のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて約25塩基相当の相補鎖の最後の塩基がGまたはCになるように長さを選択して配列を付加し、リバーズ側合成DNAの3'の末端とする。

PCRは、Taqポリメラーゼまたはその他のDNAポリメラーゼを用いる通常の方法を用いることができる。増幅した目的断片は*Not* Iで消化した後、pBluescript等のプラスミドベクターの*Not* I部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシーケンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片を*Not* Iで切り出し、ゲノムcDNAを含むプラスミドの*Not* I部位にクローニングする。またプラスミドベクターを介さずにゲノムcDNAの*Not* I部位に直接挿入し、組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることも可能である。

例えば、組み換えセンダイウイルスゲノムcDNAであれば、文献記載の方法に準じて構築することができる（Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997）。例えば、*Not* I制限部位を有する18bpのスペーサー配列（5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3'）（配列番号：3）を、クローニングされたセンダイウイルスゲノムcDNA（pSeV(+)）のリーダー配列とN蛋白質のORFとの間に挿入し、デルタ肝炎ウイルスのアンチゲノム鎖（antigenomic strand）由来の自己開裂リボザイム部位を含むプラスミドpSeV18^b(+)を得る（Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820）。pSeV18^b(+)の*Not* I部位に外来遺伝子断片を挿入し、所望の外来遺伝子が組み込まれた組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることができる。

このようにして作製した組み換えパラミクソウイルスのゲノムRNAをコードするDNAを、上記のウイルス蛋白質（L、P、およびN）存在下で細胞内で転写させることにより、本発明のベクターを再構成することができる。本発明は、本発明のベクターの製造のための、本発明のベクターのウイルスゲノムRNAをコードするDNAを提供する。また本発明は、本発明のベクターの製造に適用するための、該ベクターのゲノムRNAをコードするDNAの使用に関する。組み換えウイルスの再構成は

公知の方法を利用して行うことができる (W097/16539; W097/16538; Durbin, A. P. et al., 1997, *Virology* 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, *EMBO J.* 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, *J. Virol.* 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15400-15404)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含むマイナス鎖RNAウイルスをDNAから再構成させることができる。これらの方法に準じて、本発明のベクターを再構成させることができる。ウイルスベクターDNAにおいて、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、細胞に導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能である。

具体的な手順は、(a) パラミクソウイルスゲノムRNA (ネガティブ鎖RNA) またはその相補鎖 (ポジティブ鎖) をコードするcDNAを、N、P、およびL蛋白質を発現する細胞で転写させる工程、(b) 生成したパラミクソウイルスを含む培養上清を回収する工程、により製造することができる。転写のために、ゲノムRNAをコードするDNAは適当なプロモーターの下流に連結される。転写されたゲノムRNAはN、L、およびP蛋白質の存在下で複製されRNP複合体を形成する。そして M、HN、およびF蛋白質の存在下でエンベロープに包まれたウイルス粒子が形成される。ゲノムRNAをコードするDNAは、例えばT7プロモーターの下流に連結させ、T7 RNA ポリメラーゼによりRNAに転写させる。プロモーターとしては、T7ポリメラーゼの認

識配列を含むもの以外にも所望のプロモーターを利用することができる。あるいは、インビトロで転写させたRNAを細胞にトランスフェクトしてもよい。

DNAからのゲノムRNAの最初の転写に必要なT7 RNAポリメラーゼ等の酵素は、これを発現するプラスミドまたはウイルスベクターの導入によって供給することができるし、または、例えば細胞の染色体にRNAポリメラーゼ遺伝子を、発現を誘導できるように組み込んでおき、ウイルス再構成時に発現を誘導することにより供給することもできる。またゲノムRNA、およびベクター再構成に必要なウイルス蛋白質は、例えばこれらを発現するプラスミドの導入によって供給する。これらのウイルス蛋白質の供給において、野生型またはある種の変異パラミクソウイルスなどのヘルパーウイルスを用いる。

ゲノムRNAを発現するDNAを細胞内に導入する方法には、例えば次のような方法、①目的の細胞が取り込めるようなDNA沈殿物を作る方法、②目的の細胞による取りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つDNAを含む複合体を作る方法、③目的の細胞膜に、DNA分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスによって瞬間的に開ける方法などがある。

②としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Roche)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Roche #1811169) などが挙げられる。①としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙げられ、この方法によって細胞内に入ったDNAは貧食小胞に取り込まれるが、核内にも十分な量のDNAが入ることが知られている (Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223)。ChenおよびOkayamaはトランスファー技術の最適化を検討し、1) 細胞と共沈殿物のインキュベーション条件を 2~4% CO₂、35℃、15~24時間、2) DNAは直鎖状より環状のものが活性が高く、3) 沈殿混液中のDNA濃度が 20~30 μg/mlのとき最適な沈殿が得られると報告している (Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745)。②の方法は、一過的なトラン

スフェクションに適している。古くはDEAE-デキストラン (Sigma #D-9885 M.W. 5×10^5) 混液を所望のDNA濃度比で調製し、トランスフェクションを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。③の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択性がないという点で①または②の方法に比べて汎用性が高い。効率はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界 (電極間のギャップ、電圧) の強さ、バッファの導電率、DNA濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

以上、3つのカテゴリの中で②の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、ベクター再構成のためのDNAの細胞への導入には、トランスフェクション試薬が適している。好適には Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305)、または DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Roche, Cat No. 1811169) が用いられるが、これらに制限されない。

cDNAからのウイルスの再構成は具体的には例えば以下のようにして行うことができる。

24穴から6穴程度のプラスチックプレートまたは100mmペトリ皿等で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質 (100 units/ml ペニシリンGおよび100 μ g/ml ストレプトマイシン) を含む最少必須培地 (MEM) を用いてサル腎臓由来細胞株LLC-MK2をほぼ100%コンフルエントになるまで培養し、例えば 1 μ g/ml psoralen (ソラレン) 存在下、紫外線 (UV) 照射処理を20分処理で不活化した、T7 RNAポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスvTF7-3 (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986、Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) を2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間は適宜調整することができる。感染1時間後、2~60 μ g、より好ましくは3~20 μ gの組換えセンダイウイルスのゲノムRNAをコードするDNAを、ウイルスRNPの生成に

必須なトランスに作用するウイルス蛋白質を発現するプラスミド (0.5~24 μ gの pGEM-N、0.25~12 μ gの pGEM-P、および0.5~24 μ gの pGEM-L) (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) と共にSuperfect (QIAGEN社) を用いたりポフェクション法等によりトランスフェクションする。N、P、およびLをコードする発現ベクターの量比は例えば 2:1:2 とすることが好ましく、プラスミド量は、例えば1~4 μ gの pGEM-N、0.5~2 μ gの pGEM-P、および1~4 μ gの pGEM-L程度で適宜調整する。

トランスフェクションを行った細胞は、所望により100 μ g/mlのリファンピシン (Sigma) 及びシトシンアラビノシド (AraC) 、より好ましくは40 μ g/mlのシトシンアラビノシド (AraC) (Sigma) のみを含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579) 。トランスフェクションから48~72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、RNPを含む破碎物をLLC-MK2細胞に再度トランスフェクションして培養する。または、培養上清を回収し、LLC-MK2細胞の培養液に添加して感染させ培養する。トランスフェクションは、例えばリポフェクトアミンまたはポリカチオニックリポソームなどと共に複合体を形成させて細胞に導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Roche) 、Superfect (QIAGEN #301305) 、DOTAP、DOPE、DOSPER (Roche #1811169) などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015) 。RNPが導入された細胞では、RNPからのウイルス遺伝子の発現およびRNPの複製の過程が進行しベクターが増幅する。得られたウイルス溶液を希釈 (例えば 10^6 倍) して再増幅を繰り返すことにより、ワクシニアウイルスvTF7-3は完全に除去することができる。再増幅は、例えば3回以上繰り返す。得られたベクターは-80℃で保存することができる。エンベロープ蛋白質をコー

ドする遺伝子を欠損した複製能を持たないウイルスベクターを再構成させるには、エンベロープ蛋白質を発現するLLC-MK2細胞をトランスフェクションに使用するか、またはエンベロープ発現プラスミドを共にトランスフェクションすればよい。また、トランスフェクションを行った細胞にエンベロープ蛋白質を発現するLLC-MK2細胞を重ねて培養することによって欠損型ウイルスベクターを増幅することもできる（国際公開番号 W000/70055 および W000/70070参照）。

回収されたウイルスの力価は、例えばCIU (Cell-Infected Unit) 測定または赤血球凝集活性 (HA) の測定することにより決定することができる (W000/70070; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999)。また、GFP (緑色蛍光蛋白質) などのマーカー遺伝子を搭載したベクターについては、マーカーを指標に直接的に感染細胞をカウントすることにより力価を定量することができる (例えばGFP-CIUとして)。このようにして測定した力価は、CIUと同等に扱うことができる (W000/70070)。

ウイルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、センダイウイルスベクター等の再構成においては、サル腎由来のLLCMK2細胞およびCV-1細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。これらの細胞に適当なエンベロープ蛋白質を発現させることで、そのエンベロープを有する感染性ウイルス粒子を得ることもできる。また、大量にセンダイウイルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させ、該ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったウイルスベクターの製造方法は既に開発されている (中西ら編, (1993), 「神経科学研究の先端技術プロトコールIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp. 153-172)。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ9~12日

間 37～38℃で培養し、胚を成長させる。ウイルスベクターを尿膜腔へ接種し、数日間（例えば3日間）卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組み換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ尿液を回収する。尿液からのセンダイウイルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる（田代真人,「ウイルス実験プロトコール」, 永井、石浜監修, メジカルビュー社, pp. 68-73, (1995)）。

例えば、F遺伝子を欠失したセンダイウイルスベクターの構築と調製は、以下のように行うことができる（W000/70055 および W000/70070参照）。

<1> F遺伝子欠失型センダイウイルスゲノムcDNAおよびF発現プラスミドの構築

センダイウイルス（SeV）全長ゲノムcDNA、pSeV18⁺ b(+) (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820)（「pSeV18⁺ b(+)」は「pSeV18⁺」ともいう）のcDNAをSphI/KpnIで消化してフラグメント(14673bp)を回収し、pUC18にクローニングしてプラスミドpUC18/KSとする。F遺伝子欠損部位の構築はこのpUC18/KS上で行う。F遺伝子の欠損は、PCR-ライゲーション方法の組み合わせで行い、結果としてF遺伝子のORF（ATG-TGA=1698bp）を除いて例えば atgcatgccggcagatga（配列番号：4）で連結し、F遺伝子欠失型SeVゲノムcDNA（pSeV18⁺/ΔF）を構築する。PCRは、Fの上流には [forward: 5'-gttgagtactgcaagagc / 配列番号：5, reverse: 5'-tttgccggcatgcatgtttcccaaggggagagttttgcaacc/配列番号：6]、F遺伝子の下流には [forward: 5'-atgcatgccggcagatga / 配列番号：7, reverse: 5'-tgggtgaatgagagaatcagc/配列番号：8] のプライマー対を用いたPCRの産物をEcoT22Iで連結する。このように得られたプラスミドをSacIとSalIで消化して、F遺伝子欠損部位を含む領域の断片（4931bp）を回収してpUC18にクローニングし、pUC18/dFSSとする。このpUC18/dFSSをDraIIIで消化して、断片を回収してpSeV18⁺のF遺伝子を含む領域のDraIII断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミドpSeV18⁺/ΔFを得る。

外来遺伝子は、例えばpUC18/dFSSのF遺伝子欠失部位にある制限酵素 *Nsi* I および *Ngo* MIV 部位に挿入する。このためには、例えば外来遺伝子断片を、*Nsi* I-tailedプライマーおよび*Ngo* MIV-tailedプライマーで増幅すればよい。

〈2〉 SeV-F蛋白を誘導発現するヘルパー細胞の作製

センダイウイルスのF遺伝子 (SeV-F) を発現するCre/loxP誘導型発現プラスミドの構築はSeV-F遺伝子をPCRで増幅し、Cre DNAリコンビナーゼにより遺伝子産物が誘導発現されるように設計されたプラスミドpCALNdlw (Arai, T. et al., J. Virology 72, 1998, p1115-1121) のユニークサイト *Swa* I部位に挿入し、プラスミドpCALNdlw/Fを構築する。

F遺伝子欠損ゲノムから感染ウイルス粒子を回収するため、SeV-F蛋白を発現するヘルパー細胞株を樹立する。細胞は、例えばSeVの増殖によく用いられているサル腎臓由来細胞株LLC-MK2細胞を用いることができる。LLC-MK2細胞は、10%の熱処理した不活化ウシ胎児血清(FBS)、ペニシリンGナトリウム 50単位/ml、およびストレプトマイシン 50 μ g/mlを添加したMEMで37°C、5% CO₂で培養する。SeV-F遺伝子産物は細胞傷害性を有するため、Cre DNAリコンビナーゼによりF遺伝子産物を誘導発現されるように設計された上記プラスミドpCALNdlw/Fを、リン酸カルシウム法 (mammalian transfection kit (Stratagene)) により、周知のプロトコールに従ってLLC-MK2細胞に遺伝子導入を行う。

10cmプレートを用い、40%コンフルエントまで生育したLLC-MK2細胞に10 μ gのプラスミドpCALNdlw/Fを導入後、10mlの10% FBSを含むMEM培地にて、37°Cの5% CO₂ インキュベーター中で24時間培養する。24時間後に細胞をはがし、10ml培地に懸濁後、10cmシャーレ5枚を用い、5ml 1枚、2ml 2枚、0.2ml 2枚に蒔き、G418 (GIBCO-BRL) を1200 μ g/mlを含む10mlの10%FBSを含むMEM培地にて培養を行い、2日毎に培地交換しながら、14日間培養し、遺伝子の安定導入株の選択を行う。該培地により生育してきたG418に耐性を示す細胞はクローニングリングを用いて回収する。回収した各クローンは10cmプレートでコンフルエントになるまで拡大培

養を続ける。

F蛋白質の発現誘導は、細胞を6cmシャーレにてコンフルエントまで生育させた後、アデノウイルスAxCANCReを斉藤らの方法 (Saito et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J. Virol 72, 1115-1121 (1998)) により例えば moi=3 で感染させて行う。

〈3〉 F 遺伝子欠失SeVウイルスの再構築及び増幅

上記 pSeV18⁺/ΔF の外来遺伝子が挿入されたプラスミドを以下のようにして LLC-MK2細胞にトランスフェクションする。LLC-MK2 細胞を 5×10^6 cells/dish で 100mmのシャーレに播く。T7 RNAポリメラーゼによりゲノムRNAの転写を行わせる場合には、細胞培養24時間後、ソラレン (psoralen) と長波長紫外線 (365nm) で 20 分間処理したT7 RNAポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス (PLWUV-VacT7 : Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)) をMOI 2程度で室温で1時間感染させる。ワクシニアウイルスへの紫外線照射には、例えば15ワットバルブを5本が装備された UV Stratalinker 2400 (カタログ番号 400676 (100V), ストラタジーン社, La Jolla, CA, USA) を用いることができる。細胞を無血清のMEMで洗浄した後、ゲノムRNAを発現するプラスミド、およびパラミクソウイルスのそれぞれN、P、L、F、およびHN蛋白質を発現する発現プラスミドを、適当なりポフェクション試薬を用いてこの細胞にトランスフェクトする。プラスミドの量比は、これに限定されないが、好適には順に 6 : 2 : 1 : 2 : 2 : 2 とすることができる。例えば、12 μ gのゲノムRNAを発現するプラスミド、並びにN、P、L、および FプラスHN蛋白質を発現する発現プラスミド (pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L及びpGEM/F-HN; W000/70070, Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)) を、それぞれ12 μ g, 4 μ g, 2 μ g, 4 μ g及び 4 μ g/dishの量比トランスフェクトする。数時間培養後、血清を含まないMEMで細胞を2回洗浄し、40 μ g/mLの Cytosine β -D-arabinofuranoside (AraC : Sigma, St. Louis, MO) 及び7.5 μ g/mLのTrypsin (Gibco-BRL, Rockville, MD) を含むMEM

で培養する。これらの細胞を回収し、ペレットをOptiMEM に懸濁する (10^7 cells/ml)。凍結融解を3回繰り返してlipofection reagent DOSPER (Boehringer mannheim)と混合し (10^6 cells/ $25\mu\text{l}$ DOSPER) 室温で15分放置した後、上記でクローニングしたF発現ヘルパー細胞にトランスフェクション (10^6 cells /well 12-well-plate) し、血清を含まないMEM ($40\mu\text{g/ml}$ AraC, $7.5\mu\text{g/ml}$ トリプシンを含む)で培養し、上清を回収する。F以外の遺伝子、例えばHNまたはM遺伝子を欠損したウイルスも、これと同様の方法で調製することができる。

ウイルス遺伝子欠損型ベクターを調製する場合、例えば、ベクターに含まれるウイルスゲノム上で欠損しているウイルス遺伝子が異なる2種またはそれ以上のベクターを同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するウイルス蛋白質が、他のベクターからの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウイルス粒子が形成され、複製サイクルがまわりウイルスベクターが増幅される。すなわち、2種またはそれ以上の本発明のベクターを、ウイルス蛋白質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのウイルス遺伝子欠損型ウイルスベクターの混合物を大量かつ低コストで生産することができる。これらのウイルスは、ウイルス遺伝子が欠損しているため、ウイルス遺伝子を欠損していないウイルスに比べゲノムサイズが小さくなりサイズの大きい外来遺伝子を保持することができる。また、ウイルス遺伝子の欠損により増殖性がないこれらのウイルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることから、不稔化するため、環境放出管理上の利点がある。

本発明のパラミクソウイルスにより導入する外来遺伝子としては、特に制限はないが、天然の蛋白質としては、例えばホルモン、サイトカイン、増殖因子、受容体、細胞内シグナル分子、酵素、ペプチドなどが挙げられる。蛋白質は分泌蛋白質、膜蛋白質、細胞質蛋白質、核蛋白質などであり得る。人工的な蛋白質としては、例えば、キメラ毒素などの融合蛋白質、ドミナントネガティブ蛋白質 (受

容体の可溶性分子または膜結合型ドミナントネガティブ受容体を含む)、欠失型の細胞接着分子および細胞表面分子などが挙げられる。また、分泌シグナル、膜局在化シグナル、核移行シグナル等を付加した蛋白質であってもよい。導入遺伝子としてアンチセンスRNA分子またはRNA切断型リボザイムなどを発現させて、T細胞で発現する特定の遺伝子の機能を抑制することもできる。外来遺伝子として疾患の治療用遺伝子を用いてウイルスベクターを調製すれば、このベクターを投与して遺伝子治療を行うことが可能となる。本発明のウイルスベクターの遺伝子治療への応用としては、直接投与による遺伝子発現、間接 (ex vivo) 投与による遺伝子発現のいずれの方法によっても、治療効果を期待できる外来遺伝子もしくは患者の体内で供給が不足している内在遺伝子等を発現させることが可能である。また本発明の方法は、再生医療における遺伝子治療ベクターとしても利用できる。

なお、複製性のパラミクソウイルスベクターを個体または細胞に投与後、治療が完了するなどウイルスベクターの増殖を抑止する必要が生じた際には、RNA依存性RNAポリメラーゼ阻害剤を投与すれば、宿主に障害を与えずにウイルスベクターの増殖だけを特異的に抑止することもできる。

本明細書に記載したウイルス製造方法に従えば、本発明のウイルスベクターは、例えば 1×10^5 CIU/mL以上、好ましくは 1×10^6 CIU/mL以上、より好ましくは 5×10^6 CIU/mL以上、より好ましくは 1×10^7 CIU/mL以上、より好ましくは 5×10^7 CIU/mL以上、より好ましくは 1×10^8 CIU/mL以上、より好ましくは 5×10^8 CIU/mL以上の力価でウイルス産生細胞の細胞外液中に放出させることが可能である。ウイルスの力価は、本明細書および他に記載の方法により測定することができる (Kiyotani, K. et al., Virology 177(1), 65-74 (1990); W000/70070)。

回収したパラミクソウイルスベクターは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション (濾過)、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。

。「実質的に純粋」とは、ウイルスベクターが、それが存在する試料中の成分として主要な割合を占めることを言う。典型的には、実質的に純粋なウイルスベクターは、試料中に含まれる全蛋白質（但しキャリアーまたは安定剤として加えた蛋白質は除く）のうち、ウイルスベクター由来の蛋白質の割合が10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。パラミクソウイルスの具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法（特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報）、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法（W097/32010）等を例示することができる。

ベクターを含む組成物の製造においては、ベクターは必要に応じて薬理的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせることができる。「薬学的に許容される担体または媒体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を有意に阻害しない材料である。例えばベクターを生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、または培養液などで適宜希釈して組成物とすることができる。ベクターを鶏卵で増殖させた場合等においては尿液を含んでもよい。またベクターを含む組成物は、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の担体または媒体を含んでもよい。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。また保存剤またはその他の添加剤を添加することができる。本発明のベクターを含む組成物は試薬として、および医薬として有用である。

本発明のベクターを用いたT細胞への遺伝子導入は、様々な疾患に対する遺伝子治療に適用することが期待される。このような遺伝子治療には、例えば、遺伝子欠損による細胞での発現の異常を補正するために、また、外来遺伝子を細胞に導入することにより新しい機能を付加させるために、あるいは、ある遺伝子に対し

て抑制的に働く遺伝子を導入することにより細胞における望ましくない作用を抑制するために行い得る。

本発明の方法は、例えば自己免疫疾患等において拒絶反応を抑制するために有用である。例えばアロ抗原、あるいは自己免疫疾患の原因となる主要な抗原を認識する活性化T細胞樹立株を用いて、そのT細胞に本発明の方法に従って抑制性サイトカイン、例えばIL-10等を強発現させることによって、生体内のT細胞のアロ反応を抑制、あるいは抑制性樹状細胞の誘導により、拒絶反応をコントロールできると予想される。また、本発明の方法によるT細胞への遺伝子導入を介した癌治療も期待される。例えば、腫瘍特異的抗原を認識するT細胞に血管増殖抑制遺伝子をコードするベクターを導入することにより、局所の腫瘍増殖抑制効果が期待される。あるいは脱髄疾患である多発性硬化症などの場合にはそのターゲットとなる抗原で活性化したT細胞を用い、oligodendrocyteを幹細胞より分化させ得るPDGF (platelet derived growth factor-A) などの遺伝子を導入し、局所でのoligodendrocyte再生を促し、病勢のコントロールが可能と予想される (Vincent, K. T. et al., Journal of Neuroimmunology, 2000, 107: 226-232)。その他にも、抗原活性化T細胞あるいは抗原非特異的活性化T細胞 (抗体またはマイトゲンを使用する活性化T細胞) を用い、遺伝子導入することにより治療効果が期待されるすべての疾患・傷害に対して、本発明の方法を適用することが可能である。

パラミクソウイルスにより導入された遺伝子の転写は、インターフェロン (IFNs) などの宿主由来の因子により影響を受ける (Kato, A. et al., J. Virol., 2001, 75: 3802-3810)。アロ抗原で刺激したT細胞株からは大量のIFNが産生されることから、IFN- γ などのIFNがパラミクソウイルスベクターからの遺伝子の転写に影響を与える可能性がある (Biron, C. A. and Sen, G. C., Interferons and other cytokine. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields of virology. Vol. 2. Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, 1996. 321-351)。実際、本発明者らは、IFN- γ 受容体欠損マウスからのアロ活性化T細胞株

は、3週間以上にわたってEGFPの比較的高い発現が持続することを見いだした。従って、T細胞を指向した遺伝子治療において、標的遺伝子の高いレベルの発現が必要な場合には、IFN- γ のシグナル伝達を抑制することが有効と考えられる。

ベクターの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。投与経路は適宜選択することができる。また局所あるいは全身に投与し得る。投与されるベクターは好ましくは約 10^5 CIU/mlから約 10^{11} CIU/ml、より好ましくは約 10^7 CIU/mlから約 10^9 CIU/ml、最も好ましくは約 1×10^8 CIU/mlから約 5×10^8 CIU/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。ヒトにおいては1回当たりの投与量は 2×10^5 CIU～ 2×10^{11} CIUが好ましく、投与回数は、1回または臨床上容認可能な副作用の範囲で複数回可能であり、1日の投与回数についても同様である。ヒト以外の動物についても、例えば目的の動物とヒトとの体重比または投与標的部位の容積比（例えば平均値）で上記の投与量を換算した量を投与することができる。エキスピボ投与の場合は、体外（例えば試験管またはシャーレ内）でT細胞にベクターを接触させる。MOIは1～500の間で投与することが好ましく、より好ましくは2～300、さらに好ましくは3～200である。本発明のベクターを含む組成物の投与対象としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての哺乳動物が含まれる。

図面の簡単な説明

図1は、マウスT細胞におけるSeVによる遺伝子導入効率を示す図である。活性化またはナイーブT細胞における遺伝子導入効率を示す。マウスリンパ球を 2.5×10^7 PFU (MOI 62.5) のSeV-EGFPの存在下または非存在下で2日間培養し、細胞を回収してAPC結合抗CD3およびPE結合抗CD4（上パネル）または抗CD8（下パネル）抗体で染色した。ドットプロットは、生存しているCD3⁺ CD4⁺ または CD3⁺ CD8⁺

リンパ球中のそれぞれ CD4またはCD8と、GFPの発現を示す。四分割したそれぞれの右上の隅に、EGFP陽性細胞の割合として遺伝子導入効率を示した。左のパネル：抗体をコートしていないウェルで細胞を培養した。中央のパネル：活性化抗体（抗CD3および抗CD28抗体）をコートしたウェルで細胞を培養した。右のパネル：活性化抗体（抗CD3および抗CD28抗体）をコートしたウェルで、SeV-EGFPなしで細胞を培養した。陰性対照として、ルシフェラーゼを発現するSeV-luciと共に培養した細胞からも類似したデータを取得した。4回より多い独立した実験から、再現性のあるデータが得られた。

図2は、T細胞株へのSeVによる遺伝子導入効率を示す図である。T細胞株を 2.5×10^7 PFU (MOI 62.5) のSeV-EGFPの存在下または非存在下で2日間培養し、細胞を回収してAPC結合抗CD3およびPE結合抗CD4（上パネル）または抗CD8（下パネル）抗体で染色した。最も左のパネルのドットプロットは、ゲート（区分）された生存しているリンパ球中のCD3およびCD4またはCD8の発現を示す。それぞれの四分割の割合が示されている。他のパネルのドットプロットはゲートされたCD3陽性の生存リンパ球中のCD4またはCD8 T細胞のEGFPの発現を示す。左から2番目のパネルでは、細胞を照射B6スティミュレーター（刺激細胞）と共に培養した。3番目のパネルでは、細胞を照射Balb/cスティミュレーター（刺激細胞）と共に培養した。最後のパネルでは、細胞を照射Balb/cスティミュレーター（刺激細胞）と共にSeV-EGFPなしで培養した。4回より多い独立した実験から、再現性のあるデータが得られた。

図3は、ナイーブT細胞およびT細胞株のアロ抗原特異的活性化における遺伝子導入効率を示す図である。ナイーブ2Cリンパ球（上パネル；“1x”の文字）または2C T細胞株（下パネル；“3x”の文字）を 2.5×10^7 PFU のSeV-EGFPの存在下または非存在下で2日間培養し、細胞を回収して、APC結合抗CD8およびビオチン結合抗クロノタイプT細胞レセプター mAb (1B2) で染色し、さらにPEストレプトアビジンで染色した。一番左のパネルは、ゲートされた生存リンパ球中のCD8⁺ 1B2⁺ T細胞の割合

を示す。他のパネルのドットプロットは、生存しているクロノタイプT細胞のEGFPの発現を示す。左から2番目のパネルでは、細胞を照射B6スティミュレーター（刺激細胞）と共に培養した。3番目のパネルでは、細胞を照射Balb/cスティミュレーター（刺激細胞）と共に培養した。最後のパネルでは、細胞を照射Balb/cスティミュレーター（刺激細胞）と共にSeV-EGFPなしで培養した。2回の独立した実験から、再現性のあるデータが得られた。

図4は、SeVによる遺伝子導入におけるバイスタンダー活性化の効果を示す図である。50 μ lの2Cナীবリンパ球 (1×10^7 /ml) および 50 μ lのB6ナীবリンパ球 (1×10^7 /ml) を、 2.5×10^7 PFU のSeV-EGFPの存在下 (X軸の表示が+のもの) または非存在下 (X軸の表示が-のもの)、100 μ lの照射したBalb/c (黒いバー)、B6 (灰色のバー)、または C3H (チェックのバー) リンパ球 (1×10^7 /ml) またはリンパ球なし (白のバー) で2日間刺激した。ゲートされた生存しているCD8⁺ 1B2⁺ T細胞からEGFP陽性細胞の割合を得た。Y軸はEGFP陽性のクロノタイプ細胞の割合を示す。個々のデータは3連にしたウェル (n=3) の平均±標準誤差 (SEM) として示し、2回の独立した実験で類似した結果を得た。C3Hで刺激した2C T細胞とBalb/cで刺激した2C T細胞との間には統計学的有意差 ($p < 0.01$) があったが、C3Hで刺激した2C T細胞とB6で刺激した2C T細胞との間にはそれがなかった。統計学的有意性は一元配置分散分析法及びFisher's PLSD testを用いて決定した。

図5は、SeV-EGFPにより遺伝子導入されたT細胞のGFP発現の維持を示す図である。2C-tgマウスからのT細胞株を、SeV-EGFPの存在下、B6 (左カラム) またはBalb/c (右カラム) の照射したリンパ球で6日間刺激し、遺伝子導入したT細胞を新しい培地で洗浄後、SeVなしで、照射したB6またはBalb/cスティミュレーターで6または7日間再刺激した。ドットプロットは生存しているクロノタイプT細胞中のEGFPの発現を示す。四分割の各右上の隅の数字は、day 13 (上パネル) および day 20 (中央パネル) におけるEGFP陽性または陰性のクロノタイプT細胞の割合を示す。陰性対照として、20日間刺激した非感染2C T細胞株からのデータを示した

(下パネル)。データは2回の独立した実験の代表例である。

図6は、ヒトT細胞へのSeVによる遺伝子導入効率を示す図である。活性化またはナイーブT細胞における遺伝子導入効率を示す。200 μ lのヒトリンパ球(4×10^6 /ml)を 2.5×10^7 PFU (MOI 31)のSeV-EGFPの存在下または非存在下、2日間培養し、細胞を回収してAPC結合抗CD3およびPE結合抗CD4(上パネル)または抗CD8(下パネル)抗体で染色した。ドットプロットは、生存しているCD3⁺CD4⁺またはCD3⁺CD8⁺Tリンパ球中のそれぞれCD4またはCD8と、GFPの発現を示す。遺伝子導入効率は、示されているT細胞中のEGFP陽性細胞の割合として示した。左のパネル：抗体をコートしていないウェルで細胞を培養した。中央のパネル：活性化抗体(抗CD3および抗CD28抗体)をコートしたウェルで細胞を培養した。右のパネル：活性化抗体(抗CD3および抗CD28抗体)をコートしたウェルで、SeV-EGFPなしで細胞を培養した。陰性対照として、SeV-luciと共に培養した細胞からも同様にデータを取得した。四分割の各右隅の数字はその集団の割合を示す。4回より多い独立した実験から、再現性のあるデータが得られた。

図7は、ヒトナイーブまたはメモリー/活性化T細胞への遺伝子導入の効率を示す図である。新しく単離したT細胞を抗体をコートしていないウェルでSeV-EGFPと共に2日間培養し、細胞を回収してAPC結合抗CD62L、PE結合抗CD3、およびビオチン化抗CD45RA抗体で染色し、続いてストレプトアビジンPerCPで染色した。左のパネルで、ドットプロットはゲート(区分)された生存CD3陽性T細胞中のCD62LおよびCD45RAの発現を示す。右のパネルで、ドットプロットは、ナイーブT細胞であるCD62L^{high}およびCD45RA^{high}T細胞中(上パネル)、またはメモリー/活性化T細胞であるその他の細胞中(下パネル)のCD3およびEGFPの発現を示す。健常者ドナーからの3回の実験において再現性のあるデータが得られた。

図8は、ヒトT細胞株への遺伝子導入効率を示す図である。ヒトT細胞株を図6のようにSeV-EGFPの存在下または非存在下、2日間培養し、図6のように解析した。CD4(上パネル)あるいはCD8(下パネル)T細胞中のEGFP発現割合を示した。左

のパネル；抗体をコートしていないウェルで細胞を培養した。中央パネル；抗体（ヒト抗CD3およびヒト抗CD28抗体）をコートしたウェルで細胞を培養した。右パネル；抗体（ヒト抗CD3およびヒト抗CD28抗体）をコートしたウェルでSeV-EGFP非存在下に細胞を培養した。

図9は、ナイーブまたは活性化T細胞へのSeVの侵入（entry）の評価を示す図である。B6リンパ球（ $4 \times 10^6/\text{ml}$ ）をUVで不活化したSeV-luciの存在下（白および灰色のバー）または非存在下（黒のバー）で30分37℃でインキュベートした後、細胞をよく洗浄し、SeV-EGFP（MOI=62.5）を共に30分37℃でインキュベートした。細胞を3回洗浄した後、 $200 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液（ $2 \times 10^6/\text{ml}$ ）をマウス抗CD3およびマウス抗CD28抗体をコートした活性化ウェル中でウイルスなしで2日間培養した。陽性対照として、調製した細胞を 2.5×10^7 PFU のSeV-EGFPと共に活性化ウェル中で2日間培養した（白いバー）。回収した細胞は、APC結合抗CD3およびPE結合抗CD8抗体で染色した。ゲート（区分）した生存CD3⁺ CD4⁺ または CD3⁺ CD8⁺ T細胞からEGFP陽性細胞の割合を得た。Y軸は、EGFP陽性の CD4（左の3つのバー）または CD8（右の3つのバー）T細胞の割合を示す。個々のデータは3連にしたウェル（n=3）の平均の割合±SEMとして示した。各群間で統計学的有意差があった（ $p < 0.01$ ）。統計学的有意性は一元配置分散分析法及びFisher's PLSD testを用いて決定した。

図10は、ナイーブまたは活性化T細胞へのSeVの侵入（entry）の評価を示す図である。B6リンパ球をSeV-EGFP（MOI=100）の非存在下（X軸の一番左のスケール）または存在下（X軸のその他のスケール）、30分4℃でインキュベートし、細胞をよく洗浄し、SeVなしで0、15、30、45、および90分37℃でインキュベートした。3回洗浄後、それぞれ図示した期間インキュベートした細胞を、マウス抗CD3およびマウス抗CD28抗体をコートした活性化ウェル中で2日間培養した。細胞を回収し、図9に記載した通りに染色した（CD4 T細胞は黒い円、CD8 T細胞は黒い四角）。陽性対照として、調製した細胞を 2.5×10^7 PFU（MOI=62.5）のSeV-EGFPと共に培養した（CD4 T細胞は白い円、CD8 T細胞は白い四角）。値は3連にしたウェル

($n=3$) の平均の割合 \pm SEMとして示した。CD4 T細胞およびCD8 T細胞の両方において、37°C0分のインキュベーションにおける値と15分のインキュベーションにおける値との間に統計学的有意差があった ($p<0.01$)。さらに、37°C0分のインキュベーションにおける値と90分のインキュベーションにおける値との間にも統計学的有意差があった ($p<0.01$)。統計学的有意性は一元配置分散分析法及びFisher's PLSD testを用いて決定した。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。統計的有意性は一元配置分散分析法及びFisher's PLSD testを用いて決定した。P<0.05を統計的有意とした。

動物

近交系雌 C57BL/6 (H-2^b) (B6と略記する)、C3H (H-2^k)、および雌 Balb/c (H-2^d) マウス (Charles Riverグレードマウス) はKBTオリエンタル (Tosu, Japan) より得た。クラスI MHC抗原L^d反応性T細胞レセプター (TCR) のトランスジェニックマウスである2Cトランスジェニックマウス (2c-tg, H-2^b) は文献 Sha, W. C. et al., Nature, 1988, 335: 271-274 に記載されている。マウスは全て人道的に扱い、特定病原菌フリーで維持し、標準的なげっ歯類用の餌および水道水を与えた。7から9週齢のマウスを使用した。動物実験は、九州大学における動物実験倫理委員会 (Committee of Ethics on Animal Experiments) および組み換えDNA実験委員会 (Committee of Recombinant DNA Experiments) の検査を受け、九州大学の「動物実験ガイドライン」に従って実施した。また、アメリカ国立衛生研究所 (National Institute of Health) の「研究室動物のケアの原則」 (Principles of Laboratory Animal Care) および「研究室動物のケアおよび使用のための指針」 (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) にも従った。

組み換えSeVの構築

EGFP（クラゲ増強緑色蛍光蛋白質）遺伝子またはホタルルシフェラーゼ遺伝子を持つSeV（それぞれSeV-EGFPまたはSeV-luci）は、文献の記載の通りに構築した（Kato, A. et al., *Genes Cells*, 1996, 1: 569-579; Sakai, Y. et al., *FEBS Lett.*, 1999, 456: 221-226）。具体的には、*Not* I 制限酵素部位を含む 18 bp のスペーサー配列 5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3'（配列番号：3）を、SeVのゲノムをコードするcDNAを含むベクターの5' 非翻訳領域とヌクレオカプシド（N）遺伝子の開始コドンとの間に挿入した。クローン化されたSeVゲノムcDNAを含むこのベクターには、デルタ肝炎ウイルスのアンチゲノム鎖の自己切断型リボソーム部位も含まれている。*Not* I部位と、外来遺伝子の発現のための新しいSeVのEおよびSシグナル配列タグのセットを含むプライマーを用いて、EGFP（SeV-EGFPについて）またはルシフェラーゼ（SeV-luciについて）をコードする全cDNAをPCRにより増幅し、上記のクローン化したゲノムの*Not* I部位に挿入した。鑄型となるSeVゲノムの全長は、外来遺伝子を含めて6の倍数の塩基となるようにした（いわゆる“6のルール”（rule of six））（Kolakofsky, D. et al., *J. Virol.*, 1998, 72: 891-899）。外来遺伝子を持つ鑄型SeVゲノム、およびN、ホスホ（P）、およびラージ（L）蛋白質をコードするプラスミド（それぞれプラスミド pGEM-N, pGEM-P, および pGEM-L）を商業的に入手可能なカチオニックリピッドと複合体を形成させ、ワクシニアウイルスvT7-3と共にCV-1またはLLCMK細胞にコトランスフェクトした（Fuerst, T.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1986, 83: 8122-8126）。40時間後、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎し、10日齢（10-day-old）の発育鶏卵の尿嚢（chorioallantoic cavity）に注入した。その後ウイルスを回収し、鶏卵中で2回継代してワクシニアウイルスを除去した。ニワトリ赤血球を用いたヘマグルチネーションアッセイによりウイルスのタイターを決定し（Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., *Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells*. Ed. by Baker AH. *Molecular Biology of*

Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999)、ウイルスは使用するまで-80℃で保存した。

モノクローナル抗体 (mAb)

ビオチン化ヒトCD45 RA (HI100) mAb、アロフィコシアニン (allophycocyanin; APC) 結合抗マウスCD3 (145-2C11)、マウスCD8 (53-6.7)、およびヒトCD62L (DREG-56) mAb、フィコエリスリン (PE) 結合抗ヒトCD3 (UCHT1)、ヒトCD4 (RPA-T4)、マウスCD4 (GK1.5)、およびマウスCD8 (53.67) mAb、PE結合ストレプトアビジン、並びにペリジニクロロフィル α プロテイン (perCP) 結合ストレプトアビジンはPharMingen (San Diego, CA, USA) より購入した。

APC結合抗ヒトCD3 (UCHT1) mAbはDAKO (Kyoto, Japan) より購入した。PE結合抗ヒトCD8 (NU-Ts/c) mAb はニチレイ (Tokyo, Japan) より購入した。抗2CクロノタイプTCR決定因子 (anti 2C clonotypic TCR determinant) mAb は、本発明者らがハイブリドーマ (1B2) (Sha, W.C. et al., Nature, 1988, 335: 271-274) の培養上清から HiTrap protein G カラム (Amersham Pharmacia Bioscience Inc., Buckinghamshire UK) を用いて精製し、EZ-Link™ NHS-LC Biotin (PIERCE Biotechnology Inc., Rockford, IL, U.S.A.) を用いてビオチン化した。

T細胞の活性化のために、PharMingen (San Diego, CA, USA) より購入した精製抗マウスCD3 (145-2C11)、マウスCD28 (37.51)、ヒトCD3 (HIT3a)、抗ヒトCD28 (CD28.2) を用いた。

細胞の調製

20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 0.2% sodium bicarbonate, 50 μ M 2-mercaptoethanol (2-ME), 10 μ g/ml gentamicine sodium, および 10% 熱不活化ウシ胎児血清 (FBS) (ICN Biomedicals, Inc., Arora, OH, U.S.A.) を加えた RPMI 1640 (SIGMA, St. Louis, MO, U.S.A.) 培地を完全培地として用いた。

マウスリンパ球の調製のため、脾臓、リンパ節を回収し完全培地中、氷上に保

持した。脾臓およびリンパ節は、培地中、2枚のガラススライドの間で組織断片に圧力をかけて破碎した。細胞懸濁液をステンレスメッシュで濾過し、培地で2回洗浄した。赤血球は塩化アンモニウム炭酸カリウムリシスバッファー (ammonium chloride potassium carbonate lysing buffer) を用いてリシスさせた。ヒト末梢血リンパ球 (PBL) については、健康者ドナーより血液を採取し、Ficoll Paque™ Plus (Pharmacia Biotech Inc., Wikstroms, Sweden) によりリンパ球を分離した。標準的なトリパンブルー色素排除アッセイ系を用いて、生存している有核細胞をカウントした。

マウス及びヒトT細胞株の樹立

アロ反応性T細胞株を調製するため、B6または2C-tgマウスのリンパ球 (5×10^7) を、30 Gy (^{137}Cs ; Gammacell 40, Atomic Energy of Canada Limited, Ottawa, Canada) を照射したBalb/cリンパ球 (5×10^7) と共に、50 ml フラスコ (35-3014; FALCON, Beckton Dickinson Bioscience, Inc., Franklin Lake, NJ, U.S.A.) 中、総量 10 ml のRPMI 1640完全培地中で6日間共培養した。活性化したアロ反応性T細胞は、10 ng/ml のヒトIL-2 (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd, Fujioka, Japan) を添加して、照射Balb/cリンパ球により週ごとに刺激した。この方法では、B6から得られるT細胞株は、ほとんどがCD8 T細胞からなることから、CD4 T細胞株を得るために、B6のCD8を枯渇させた (CD8-depleted) リンパ球を照射リンパ球で刺激した。CD8を枯渇させたリンパ球の調製のため、新しく単離したリンパ球を抗マウスCD8 (Lyt-2.2; Meiji, Tokyo, Japan) mAbと共に30分4℃でインキュベートし、続いて Low-Tox™-M Rabbit complement (Cedarlane, Ontario, Canada) と共に50分37℃でインキュベートした。3回以上刺激した、B6または2C-tgのアロ抗原活性化T細胞を、マウスT細胞株として用いた。

ヒトT細胞株を調製するため、ある健康人の末梢血リンパ球 (5×10^6) を別の健康人の放射線照射 (30 Gy) 末梢血リンパ球 (5×10^5) と10 ng/ml の human IL-2 存在下に 1 ml のRPMI-1640感染培地中で7日間共培養した。その後、7日間ごとに

少なくとも2回のリンパ球による再刺激を行ったものをT細胞株として使用した。

フローサイトメトリー解析

回収したマウス細胞を遠心分離し、抗マウスCD16/32 mAbを産生する培養ハイブリドーマ (2.4G2; American type culture collection, Manassas, VA, U.S.A) の上清 50 μ l と30分4°Cでインキュベートした。ヒトリンパ球ではこのステップは排除した。細胞を完全培地で洗浄し、mAbを様々に組み合わせて30分4°Cでインキュベートし、その後完全培地で2回洗浄した。ビオチン化mAbはPEストレプトアビジンまたはPerCPストレプトアビジンで検出した。標識した細胞はFACS Caliberにより CellQuestプログラム (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) および FLOWJOプログラム (TREE STAR, Inc., San Carlos, CA, USA) を用いて解析した。サイトメーターにアプライする直前に、死細胞を検出して排除するため 250 μ l の細胞懸濁液に 125 ng のpropidium iodide (PI) を加えた。このステップは、ヒト活性化/メモリーT細胞からのナイーブT細胞の認識においては除外した。EGFPは蛍光1 (fluorescence 1) で検出した。マウスまたはヒトの実験において、CD3⁺ CD4⁺ PI⁻ 細胞の集団を生存CD4 T細胞と表し、CD3⁺ CD8⁺ PI⁻ 細胞の集団を生存CD8 T細胞と表した。トランスジェニッククロノタイプT細胞である CD8⁺ 1B2⁺ PI⁻ 細胞を生存2c T細胞と表した。ナイーブヒトT細胞または活性化/メモリーヒトT細胞は、それぞれ CD62L⁺ CD45RA⁺ CD3⁺ 細胞としてゲート(区分)されたものまたはCD3⁺ 細胞の中のその他としてゲート(区分)されたものとした (Picker, L.J. et al., J. Immunol., 1993, 150: 1105-1121; Ostrowski, M.A. et al., J. Virol., 1999, 73: 6430-6435)。

マウスまたはヒトT細胞へのSeVによる遺伝子送達

活性化またはナイーブT細胞における遺伝子導入効率を評価するため、抗マウスCD3 mAb (15 μ g/ml) および抗マウスCD28 mAb (20 μ g/ml) でコートした、あるいはコートしていない96ウェル平底プレート (3860-096; IWAKI, Tokyo, Japan) 中で、200 μ l のマウスリンパ球 (2×10^6 /ml) の懸濁液を、 2.5×10^7 plaque forming

unit (PFU) のSeV-EGFPと共に2日間培養した。ヒトリンパ球では、抗ヒトCD3 mAb (10 μ g/ml) および抗ヒトCD28 mAb (10 μ g/ml) でコートした、あるいはコートしていない96ウェル平底プレート中で、200 μ lのヒト末梢血リンパ球 (PBL) (4 \times 10⁶/ml) またはヒトT細胞株 (4 \times 10⁶/ml) の懸濁液を、2.5 \times 10⁷ PFU のSeV-EGFPと共に2日間培養した。アロ活性化T細胞株の導入効率の評価では、2.5 \times 10⁷ PFUのSeV-EGFPと共に100 μ lのB6または2C-tgマウスのT細胞株 (2 \times 10⁶/ml) をB6またはBalb/cマウスの30 Gyを照射したリンパ球 (1 \times 10⁷/ml) 100 μ lと2日間共培養するか、あるいは200 μ lのB6または2C-tgマウスのT細胞株 (2 \times 10⁶/ml) を抗体 (抗CD3抗体および抗CD28抗体) をコートした96ウェル平底プレートで2日間、2.5 \times 10⁷ PFUのSeV-EGFPと共培養して行った。ナイーブT細胞のアロ抗原特異的活性化における遺伝子導入効率の評価では、2C-tgマウスから新しく単離したリンパ球を用いた。別の実験では、6 \times 10⁸ PFU のSeV-EGFPの存在下、2C-tgマウスからのT細胞株 (2 \times 10⁶/ml) 2.5ml を B6またはBalb/cマウスからの 30 Gy 照射リンパ球 (1 \times 10⁷/ml) 2.5ml で6日間刺激し (3または4日毎に、半分の培地を新しい培地に交換した)、遺伝子導入を行ったT細胞を新しい培地で洗浄し、SeVなしで6または7日間、照射B6またはBalb/cリンパ球で再刺激した (再刺激は6または7日毎に行った)。バイスタンダー活性化の効果を評価するためには、50 μ lの2Cナイーブリンパ球 (1 \times 10⁷/ml) および 50 μ lのB6ナイーブリンパ球 (1 \times 10⁷/ml) の混合液を、2.5 \times 10⁷ PFU のSeV-EGFPの存在下、100 μ l の照射Balb/c、B6、またはC3H リンパ球 (1 \times 10⁷/ml) 100 μ l で2日間刺激した。

各サンプルを3つのウェルに重複させ、5% CO₂ を含む湿大気中で37℃で培養した。SeVの感染後48時間でEGFPの発現は最大となった。適当な濃度の活性化mAbまたは最適化した用量のSeVを、タイトレーション実験により決定した。最大の割合でT細胞にEGFPを導入するSeVの最低の用量は、多重感染度 (Multiplicity of infection; MOI) 12.5 であり、500より高いMOIのSeVはT細胞に対して細胞変性効果 (cytopathic effect) を有していた。

ナイーブまたは活性化T細胞へのSeVの侵入 (entry) の評価

B6 リンパ球 ($4 \times 10^6/\text{ml}$) を、2000 mj のUV (UV crosslinker; Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, CA, USA) で不活化したSeV-luci (5×10^8 PFU/ml) の1:1の比での存在下または非存在下、30分37°Cでインキュベートした後、細胞を完全培地でよく洗浄し、SeV-EGFP (2.5×10^8 PFU/ml) と1:1の比で30分37°Cでインキュベートした。3回洗浄した後、200 μ lの細胞懸濁液 ($2 \times 10^6/\text{ml}$) を、抗マウスCD3 mAb (15 μ g/ml) および抗マウスCD28 mAb (20 μ g/ml) でコートした96ウェル平底プレート中で2日間培養した。最後の洗浄を行った培地中に混入しているSeVは、活性化ウェル中の前処理していないT細胞に対してほとんどEGFPを導入する能力がなかったことから、この洗浄過程は十分であったことが確認された。陽性対照として、調製した細胞を活性化ウェルにて、 2.5×10^7 PFU のSeV-EGFPと共に2日間培養した。ナイーブT細胞からの接着したSeVの解離を調べるため、10 mlのB6リンパ球 ($2 \times 10^6/\text{ml}$) を 2×10^9 PFU のSeV-EGFPの存在下または非存在下、30分4°Cでインキュベートし、細胞を完全培地でよく洗浄した後、SeVなしで 0、15、30、45、および 90分37°Cでインキュベートした。3回洗浄した後、細胞を活性化ウェル中で37°Cで2日間培養した。陽性対照として、調製した細胞を 2.5×10^7 PFU のSeV-EGFPと共に培養した。

【実施例1】 組み換えSeVは高い効率でEGFPを活性化T細胞に導入する

センダイウイルスベクターがT細胞にEGFP遺伝子を導入できるかを調べた。まず、マウスリンパ球をSeV-EGFP (MOI=62.5) と共に48時間培養した。EGFP陽性の非刺激マウスCD3⁺ CD4⁺ または CD3⁺ CD8⁺ T細胞 (それぞれCD4 T細胞またはCD8 T細胞とも称す) の割合は低かった一方 (それぞれ 0.5~1.5% または 0.8~2.0%)、固着化した抗CD3抗体および抗CD28抗体を用いて非特異的に活性化した CD3⁺ CD4⁺ または CD3⁺ CD8⁺ T細胞は高い強度でEGFPを発現し、EGFP陽性細胞の割合は劇的に上昇した (それぞれ 65~85% または 70~92%) (図1)。CD4 T細胞およびCD8 T細胞の両方の場合で、EGFP陽性細胞の割合はSeVの用量依存的に上昇し、MOIが12.5

の時にほぼプラトーのレベルに達した。

次に、抗原で活性化したT細胞株への遺伝子送達が可能か否かを調べるため、*in vivo*で免疫することなしに初代培養においてナイーブTリンパ球が応答し増殖することができるT細胞刺激抗原としてアロ抗原を用いた。C57BL/6からの非改変リンパ球とBalb/cからの照射リンパ球との共培養により生成したT細胞株は、ほとんどはCD8 T細胞からなるため、CD8 T細胞を枯渇させたリンパ球を照射した刺激リンパ球と共培養してCD4 T細胞株を得た。また、これとは別に、2c-tgマウスからのT細胞 (2c T細胞) を用いたが、これは L^d 特異的TCRを発現するナイーブT細胞クローンを大量に持っており、抗原特異的な初代T細胞の応答における遺伝子導入を観察することが可能であった。期待したように、アロ抗原で刺激したT細胞株は、照射を行ったアロジェニックなリンパ球の存在下、SeVにより効率的にEGFPが導入された (図2)。さらに、刺激するアロジェニックなリンパ球の非存在下でさえも、活性化T細胞は効率的に遺伝子導入された (図2)。この効果は、CD4 T細胞およびCD8 T細胞の両方で共通していたが、EGFP発現レベルおよび陽性細胞の割合は、CD8 T細胞株よりもCD4 T細胞株の方がわずかに低い傾向があった。これらの知見は、SeVはT細胞に対し、T細胞が活性化状態にあれば標的遺伝子を送達することができることを示している。

これらの知見をT細胞の抗原特異的応答において確認するため、 L^d に特異的に応答し、ナイーブな状態でも $CD8^+ 1B2^+$ 集団としてバルクのリンパ球の中から区別することが可能な、2c-tgマウスからのT細胞を用いた。ナイーブ2c T細胞はアロであるBalb/c刺激細胞の存在下でのみEGFPを非常に強く発現し、シンジェニックであるB6刺激細胞ではほとんど発現が見られなかったが、Balb/c刺激細胞で3回以上刺激し、活性化した2c T細胞に対しては、B6あるいはBalb/cの刺激細胞どちらの存在下でもSeVは効率的にEGFPを導入した (図3)。それに加え、単純にT細胞株をSeVと共にたった30分37℃でインキュベートしても、EGFPを最大に発現させるのに十分であった (データ省略)。

さらに、SeVによるこの非常に強い導入が抗原特異的に活性化したT細胞に限られるのかを明らかにするため、以下のような実験を行った。非抗原特異的T細胞は、in vitroでの強力なアロ応答のバイスタンダー効果により活性化され得る。C3HスティミュレーターではなくBalb/cスティミュレーターに応答することができる抗原特異的T細胞としてナイーブ2c T細胞を用いた。C57BL/6および2cナイーブT細胞の混合物からなるレスポnder（応答細胞）を、Balb/c、C57BL/6、C3H刺激細胞、または何もなしに共培養し、 2.5×10^7 PFU のSeV-EGFPを培養ウェルに添加した。この培養系において、混合リンパ球培養中でC57BL/6マウスからのT細胞がC3Hスティミュレーターに強く応答している時に、SeV-EGFPにより2c T細胞にEGFP遺伝子が導入されるかを調べることができた。C3H刺激細胞を用いると、C57BL/6 T細胞のC3Hスティミュレーターに対する応答は起こっても、2c T細胞にEGFPは導入されず、C57BL/6刺激細胞を用いた場合または刺激細胞を何も用いなかった場合と同様であった（図4）。それに対して、Balb/cスティミュレーターを用いた場合、2c T細胞はEGFPを非常に強く発現した（図4）。従って、SeVによるこの遺伝子導入は特異的な抗原で活性化されたT細胞に限定されていた。

【実施例2】 活性化T細胞におけるSeVによる導入遺伝子の発現期間

次に、導入遺伝子のin vitroでの維持について調べた。活性化2c T細胞をセンダイウイルスと共培養し、遺伝子導入されたT細胞をBalb/cスティミュレーターまたはC57BL/6スティミュレーターとin vitroで維持した。EGFPの発現は、48時間目に発現がピークとなった後は、発現レベルは急速に低下するものの、少なくとも20日間維持された（図5および省略したデータ）。EGFPの発現レベルは、Balb/cスティミュレーターにより抗原再刺激を行っても上昇しなかった。これらの知見は、アロ特異的活性化T細胞株においても観察された（データ省略）。

【実施例3】 活性化ヒトT細胞およびT細胞株への遺伝子送達

健常者から新しく単離したヒトPBLを 2.5×10^7 PFU のEGFP発現SeVベクター（MOI=30）と共に48時間培養した。マウスT細胞の場合とは対照的にEGFPの発現強

度は比較的低いものの、刺激していないヒトCD3⁺CD4⁺およびCD3⁺CD8⁺T細胞において比較的高いEGFP陽性率が得られた（それぞれ平均=23.1%、範囲15~45%、および平均=34.0%、範囲18~50%）（図6）。

本発明者らは、活性化/メモリーT細胞の集団は、特定病原菌フリー（Specific-Pathogen-Free）の条件下で維持されたマウスリンパ系組織におけるよりも、ヒトPBLにおける方が高いという仮説を立てた。活性化/メモリーT細胞からナイーブT細胞（CD45RA⁺CD62L⁺）を識別し、これらの各T細胞集団のEGFPの発現を解析した。期待したように、EGFP陽性の活性化/メモリーT細胞中のEGFP陽性細胞の割合は、ナイーブT細胞中のEGFP陽性細胞よりもはるかに高く、ナイーブT細胞中のEGFP陽性細胞の割合は4%よりも低かった（図7）。マウス実験で示したように、既に抗原で活性化したT細胞は、抗原刺激がなくても効率良くEGFPが導入されたことから、活性化/メモリーの表現型を有するT細胞中の活性化T細胞がEGFPを発現したと考えられた。それに対して、固着化した抗CD3抗体および抗CD28抗体で刺激したCD3⁺CD4⁺またはCD3⁺CD8⁺T細胞は強い強度でEGFPを発現し、EGFP陽性細胞の割合は高かった（それぞれ範囲30~69%または50~70%）（図6）。

ヒトアロ抗原刺激T細胞株においては、CD4またはCD8 T細胞ともに固着化抗体存在のもとでは、それぞれ97%または98%と非常に効率のよい導入を示した（図8）。このT細胞株についても、単純に30分37℃のインキュベートでEGFPを最大に発現させるのに十分であった。

〔実施例4〕 ベクターの接着後のSeVの侵入（entry）は活性化T細胞では起こるが、ナイーブT細胞では起こらない

SeVを介した活性化T細胞特異的な遺伝子送達の考えられる機構を調べた。遺伝子導入の効率に影響し得る要因としては、以下のようなものがありうる。(i) SeV特異的なレセプター（Markwell, M. A. and Paulson, J. C., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1980, 77: 5693-5697）、(ii) 融合のための考えられるコレセプター（Kumar, M. et al., J. Virol., 1997, 71: 6398-6406; Eguchi, A. et al.,

J. Biol. Chem., 2000, 275: 17549-17555)、(iii) T細胞の活性化によるシグナル伝達の誘導、これはSeVが侵入 (entry) した後のSeVの転写に影響し得る (Collins, P.L. et al., Parainfluenza viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields of virology. Vol. 2. Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, 1996: 1205-1241)。これらを調べるため、マウスT細胞を用いた。活性化したマウスTリンパ球はSeVにより効率的に遺伝子導入されるが、新しく単離したマウスTリンパ球はSeVによりほとんど遺伝子導入されないため、マウスT細胞を用いたこれらの実験では、活性化/メモリーT細胞からナイーブT細胞を細胞分離するプロセスは行わなかった。

まず、新しく単離したリンパ球を紫外線 (UV) で不活化したSeV-luci存在下 (前処理したナイーブT細胞) または非存在下 (前処理しないナイーブT細胞) で60分37℃でインキュベートし、T細胞の特異的レセプターを干渉させ、SeVのHNのノイラミニダーゼ活性によりシアル酸残基を遊離させた。その後、それらT細胞をSeV-EGFP (MOI=62.5) と共に30分37℃でインキュベートした。続いて、それらT細胞を、固着化した抗CD3および抗CD28抗体で刺激し、2日後にEGFPの発現レベルを調べた。SeV-EGFPで前処理したナイーブT細胞においては、続く活性化におけるCD4またはCD8 T細胞のEGFP陽性細胞の割合は、それぞれ35%または50%となった (図9)。しかしながら、UVで不活化したSeV-luciと共にインキュベートすると、活性化T細胞へのEGFPの遺伝子導入は妨げられた。不活化SeV-luciとブレインキュベーションしても、活性化の培養期間の間SeV-EGFPと共にT細胞をインキュベートするとほとんどのリンパ球はEGFPを発現したことから、前処理したT細胞でEGFPが発現しなかったのは、T細胞の生存が低下したためではない (図9)。この結果は、続くインキュベーション期間においてSeVのための特異的レセプターが回復したためであると考えられる。さらに、最後の洗浄培養液は、改変していない活性化T細胞にほとんどEGFPを導入しなかった (データ省略) ことから、洗浄の過程が不十分であった可能性は排除することができた。これらの知見は、SeVは遺伝子導入

のためにT細胞上の特異的なレセプターを使用していることを示唆している。

T細胞とSeV-EGFPとのインキュベーションの時間を決定する予備的な実験において、インキュベーション時間を延ばすと、EGFP陽性T細胞の割合が低下することが観察された。この観察から、本発明者らはSeVはナイーブT細胞に接着することはできるが、恐らくコレセプターの欠損により融合できずに、37℃というノイラミニダーゼがよく働く温度でのインキュベーションにおいて、自身がもつHNのノイラミニダーゼ活性によりナイーブT細胞からSeVが離れてしまうという仮説をたてた。そこで、新しく単離したリンパ球を、ノイラミニダーゼがほとんど働かないが、SeVがシアル酸残基に接着することはできる4℃でSeV-EGFP (MOI=100) とインキュベートした後、それらのリンパ球を新しい培地で図示した期間37℃でインキュベートした(図10)。その後、細胞を3回洗浄し、それらT細胞を固着化した抗CD3および抗CD28抗体で刺激し、2日後、GFPの発現レベルを調べた。この実験では、全てのT細胞が均一に活性化されたことから、データは、細胞のキナーゼ活性などのようなSeVの遺伝子発現に関連する要因には影響されず、侵入(entry)に関連する要因によってのみ影響を受けた。期待したように、T細胞を4℃で一度インキュベートした後に活性化すると、EGFP陽性のCD4またはCD8 T細胞の割合は、それぞれ50%または70%であった。これに対して、4℃のインキュベーションに続いて37℃でインキュベートすると、EGFP陽性T細胞の割合は時間依存的に減少した(図10)。37℃で90分のインキュベーションによりEGFP陽性T細胞の割合は最低になり、これは最後の洗浄後の培養液に混入しているSeVと活性化ウェル中で共培養した前処理なしのT細胞の割合と同等であった。活性化のための培養期間の間SeV-EGFPと共にインキュベートした陽性対照のT細胞はすべて効率的に遺伝子導入された。さらに、活性化T細胞を用いた場合、30分37℃でインキュベートするだけで、EGFP陽性T細胞の割合は陽性対照と同じくらい高かった(データ省略)。侵入(enter)したSeVがナイーブT細胞から放出されることはありそうにないことから、これらの現象は、SeVは活性化T細胞に侵入(enter)することができる一方、ナ

イーブT細胞に接着することはできるが融合できないと説明することができる。ベクター粒子は、ナイーブTリンパ球ではなく活性化Tリンパ球に特異的にインターナライゼーション (internalization; 内部化) が起こる可能性が高い。

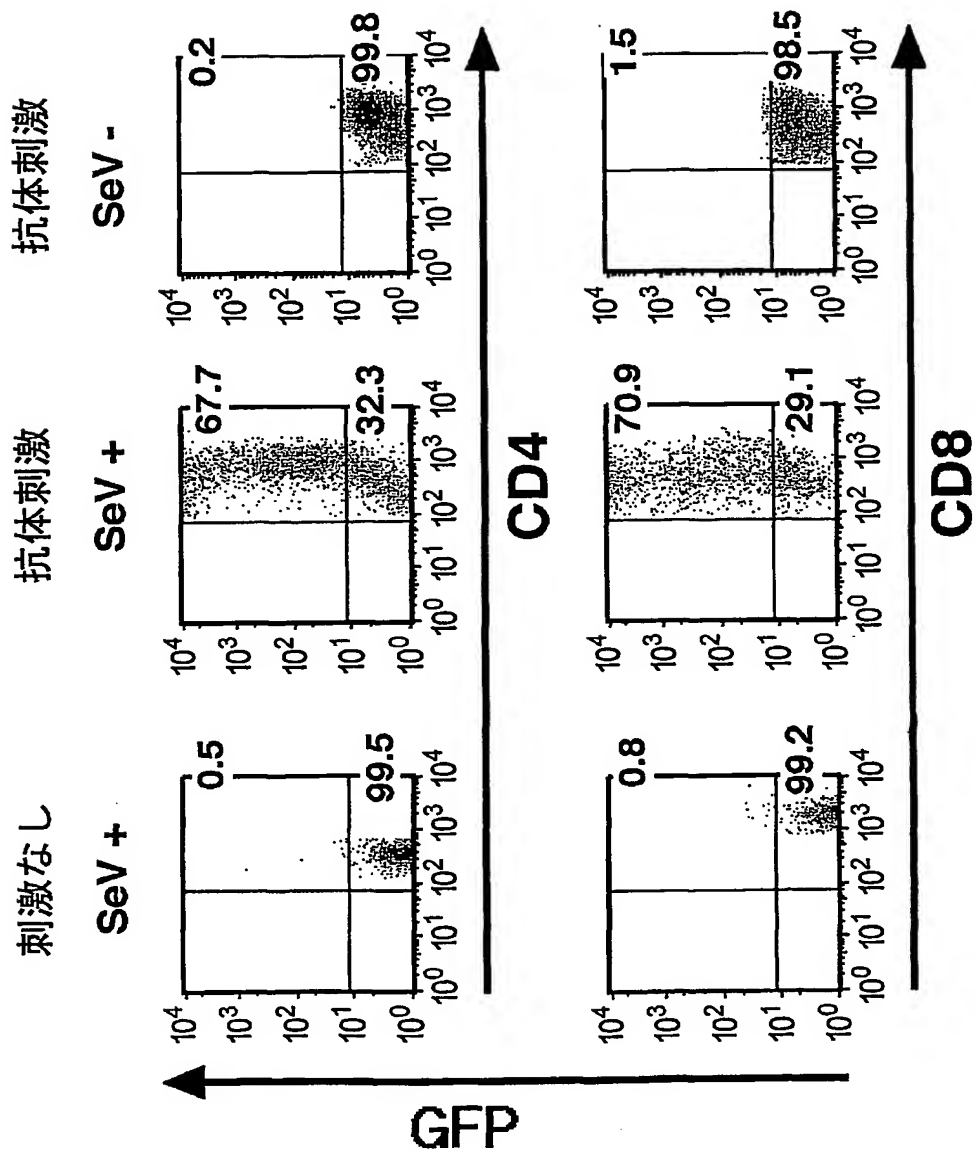
産業上の利用の可能性

本発明により、T細胞に効率的に遺伝子を導入することが可能となった。T細胞への遺伝子導入は、免疫系が関与する様々な疾患の治療にとって重要であることから、これらの疾患における、T細胞を指向した遺伝子送達による改変戦略への本発明の適用が期待される。

請求の範囲

1. T細胞に遺伝子を導入する方法であって、該遺伝子を保持するパラミクソウイルスベクターと活性化したT細胞とを接触させる工程を含む方法。
2. パラミクソウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項1に記載の方法。
3. 外来遺伝子が導入されたT細胞の製造方法であって、該遺伝子を保持するパラミクソウイルスベクターと活性化したT細胞とを接触させる工程を含む方法。
4. パラミクソウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項3に記載の方法。
5. 請求項3または4に記載の方法により製造された、外来遺伝子が導入されたT細胞。
6. 活性化T細胞への遺伝子送達のために用いる、パラミクソウイルスベクター。
7. パラミクソウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項6に記載のベクター。

図 1

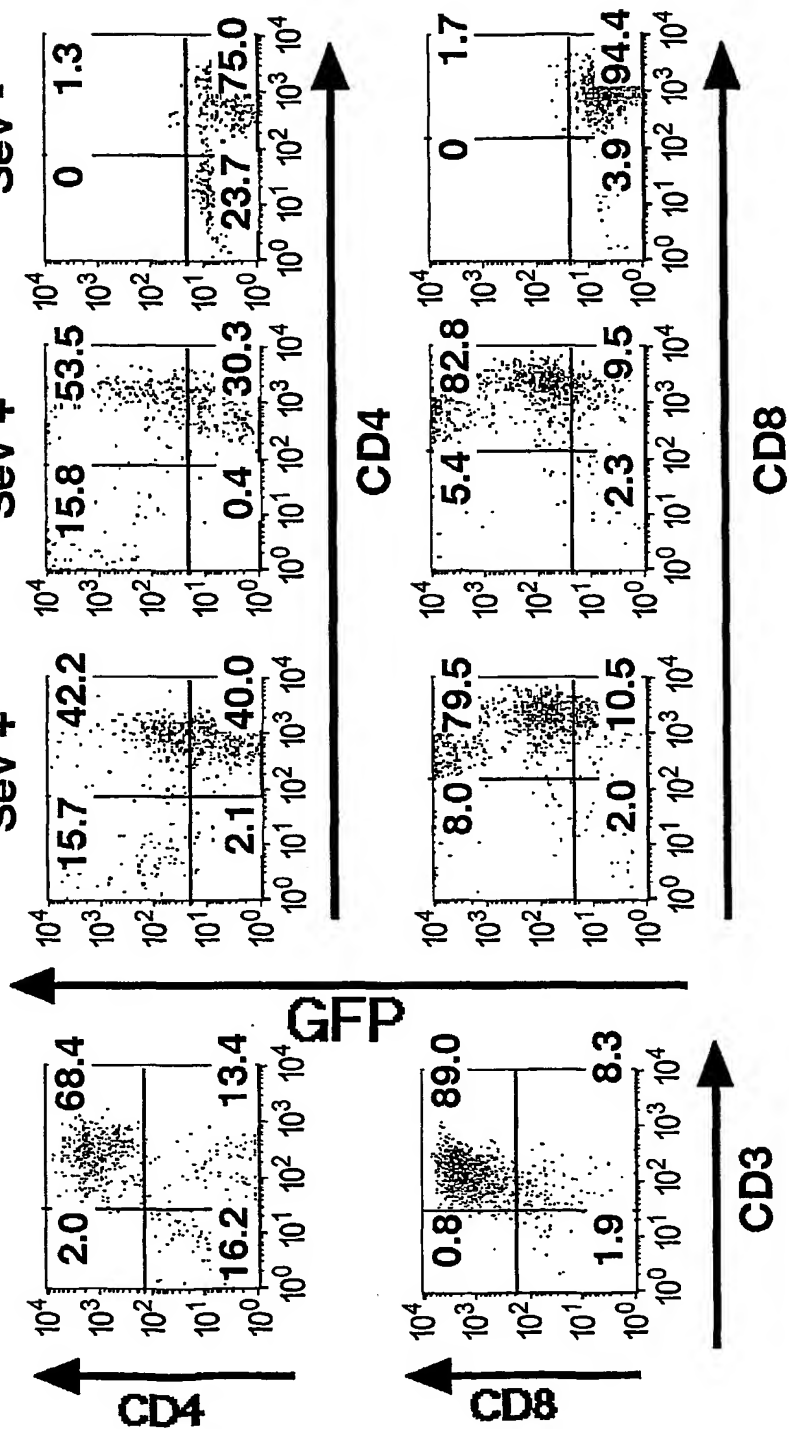


2 / 10

図 2

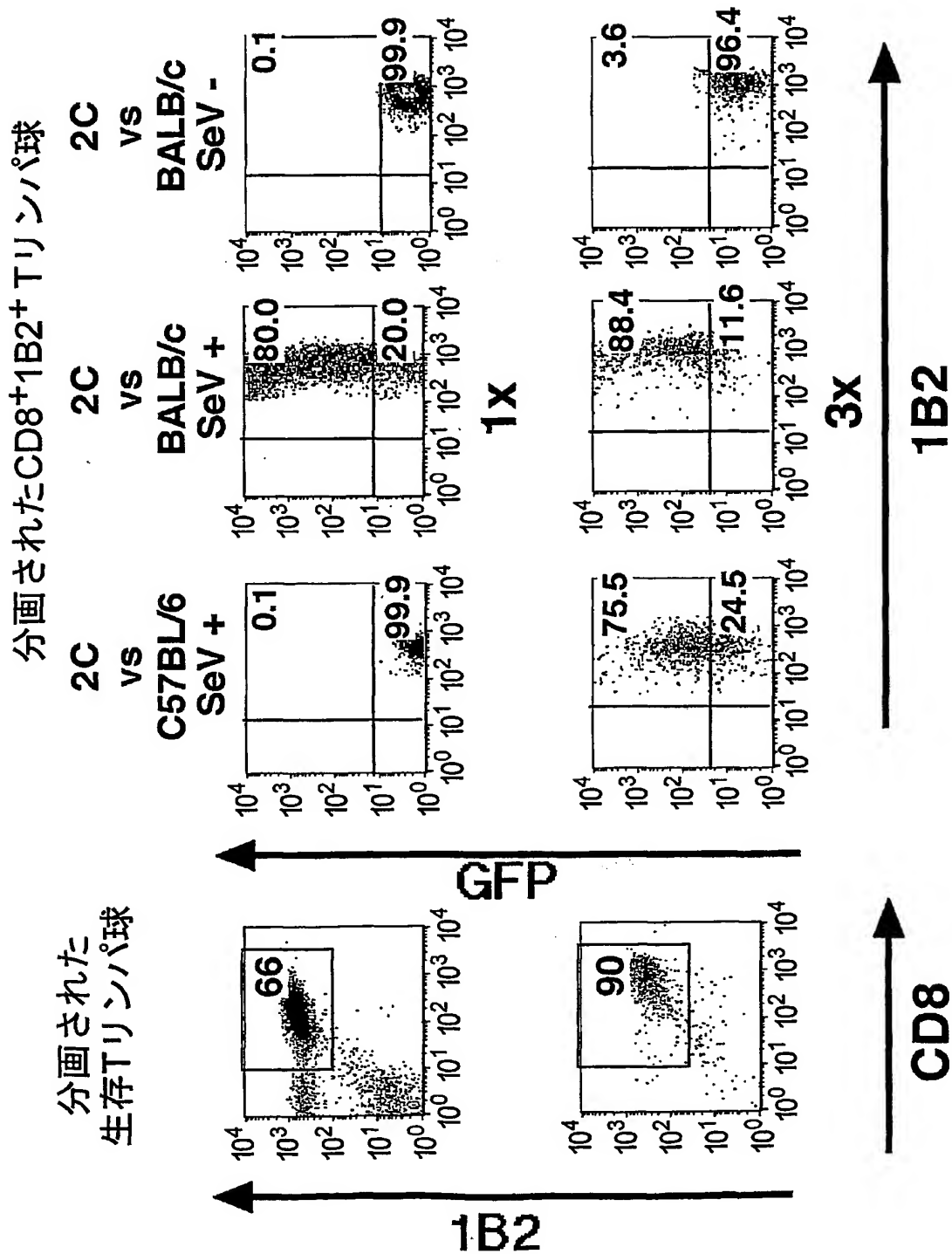
分画されたCD3⁺Tリンパ球

分画された
生存Tリンパ球



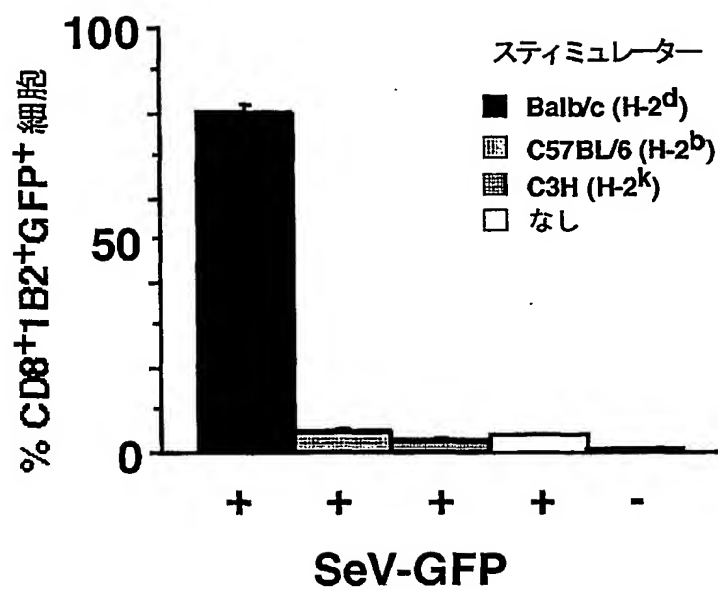
3 / 10

図 3



4/10

図4



5 / 10

図 5

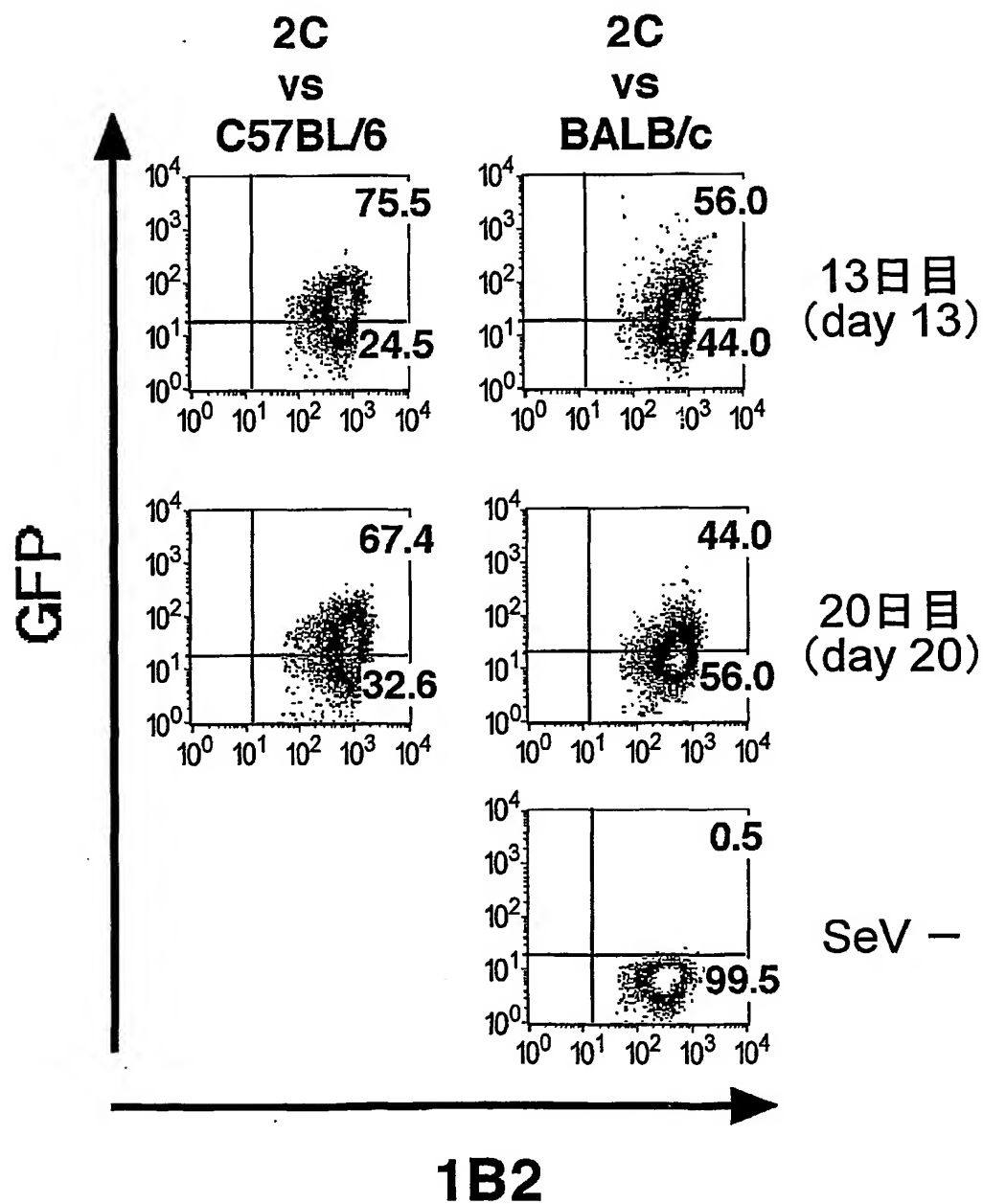
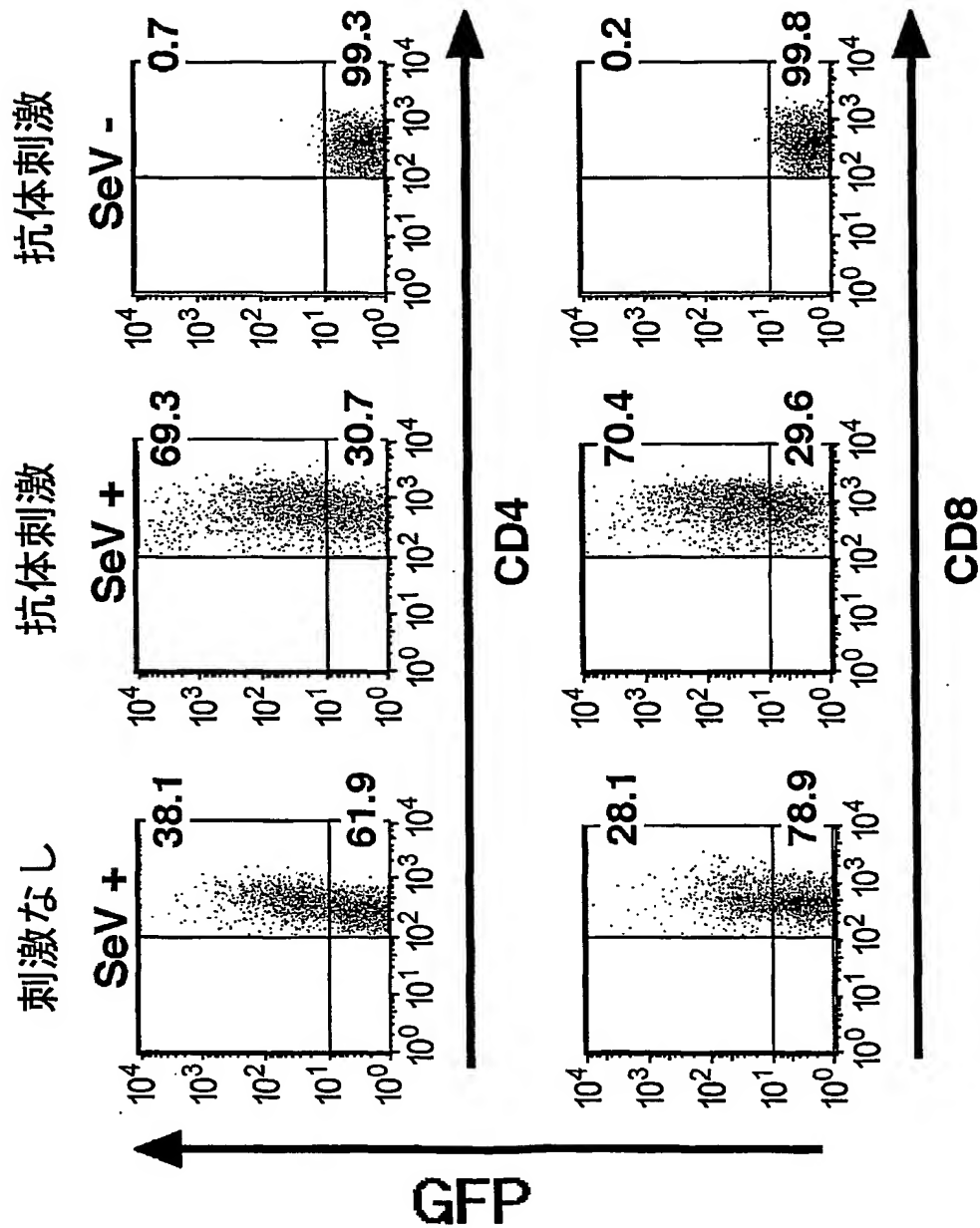


図 6



7 / 10

図 7

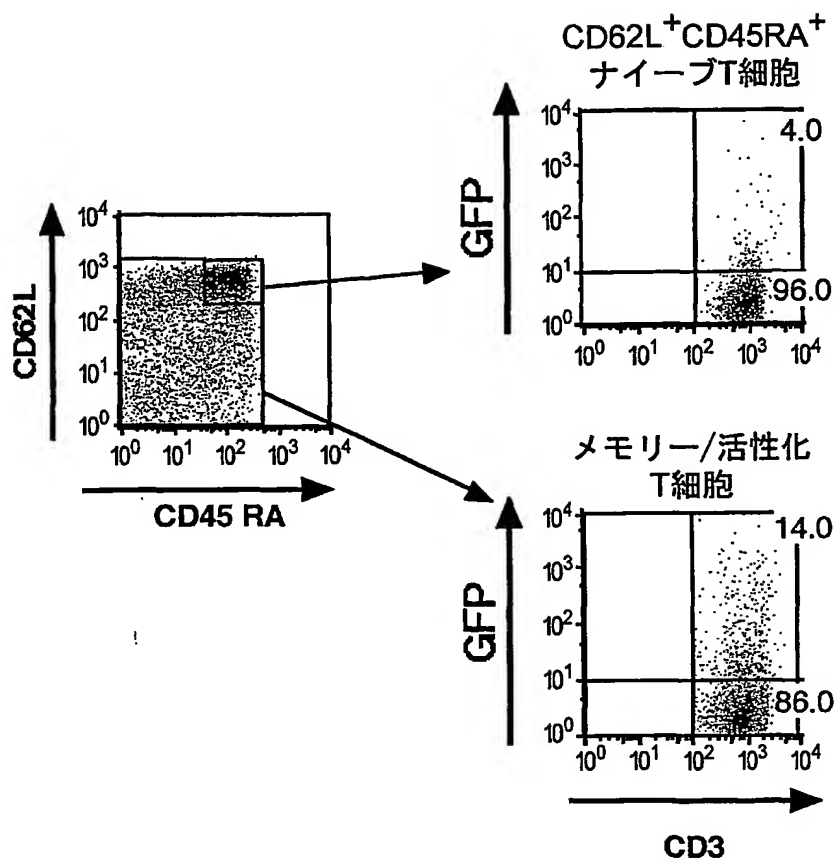
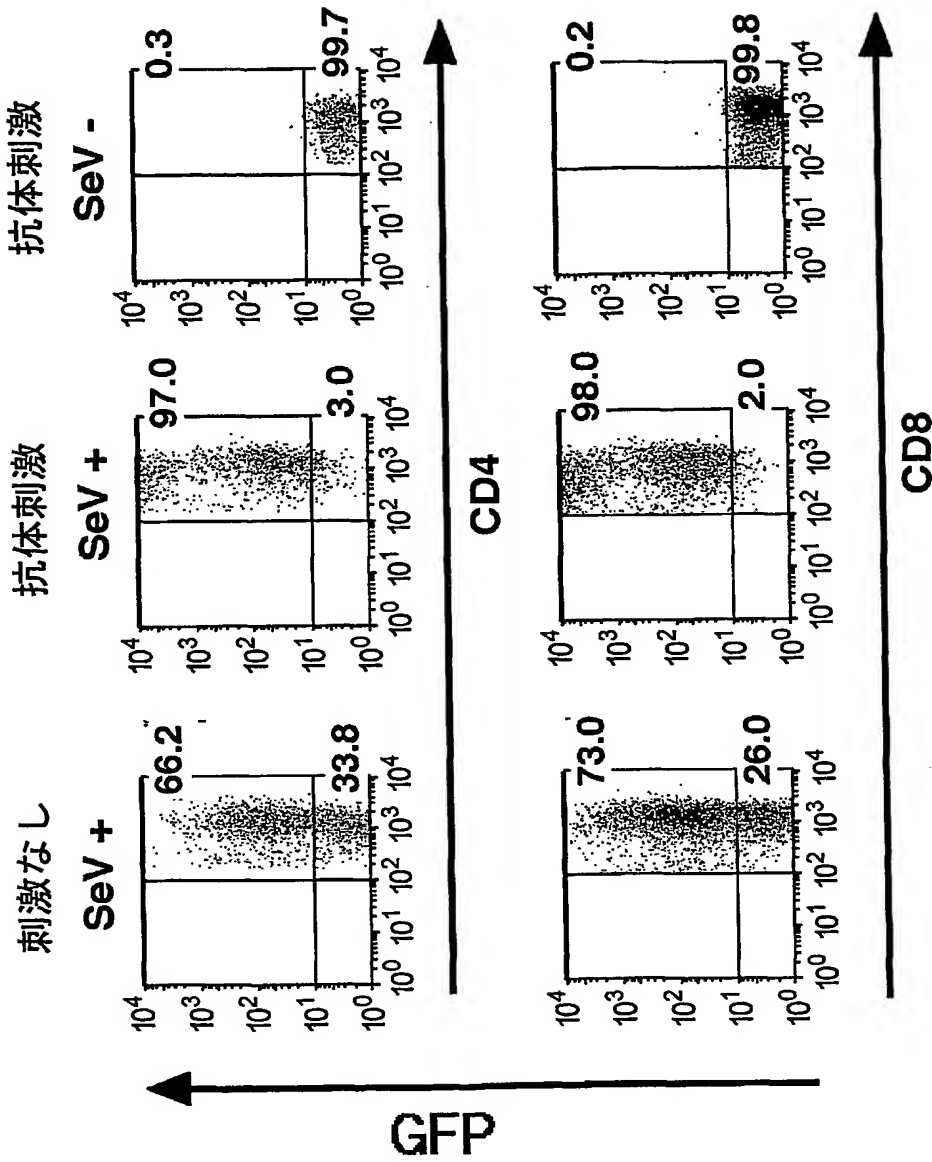
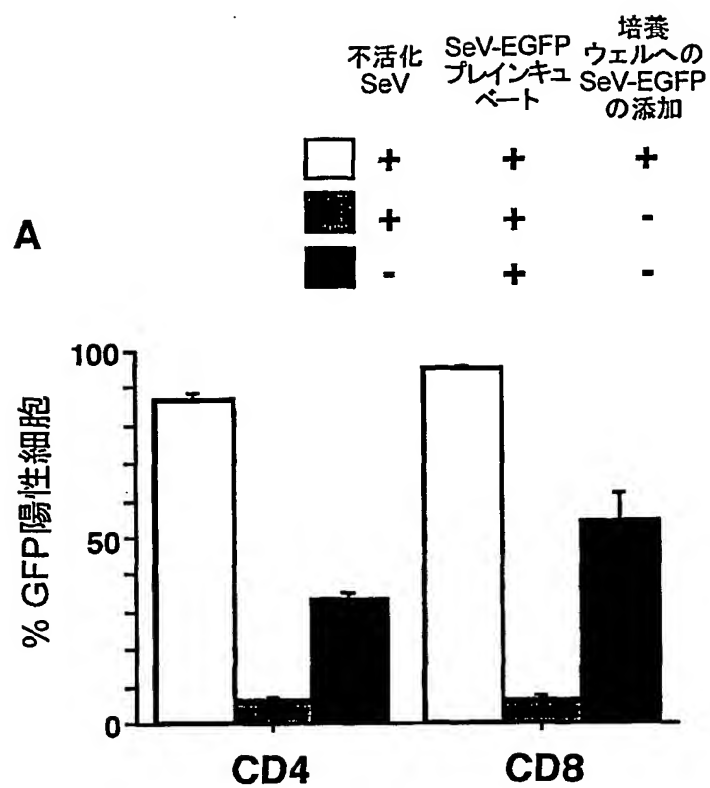


図 8



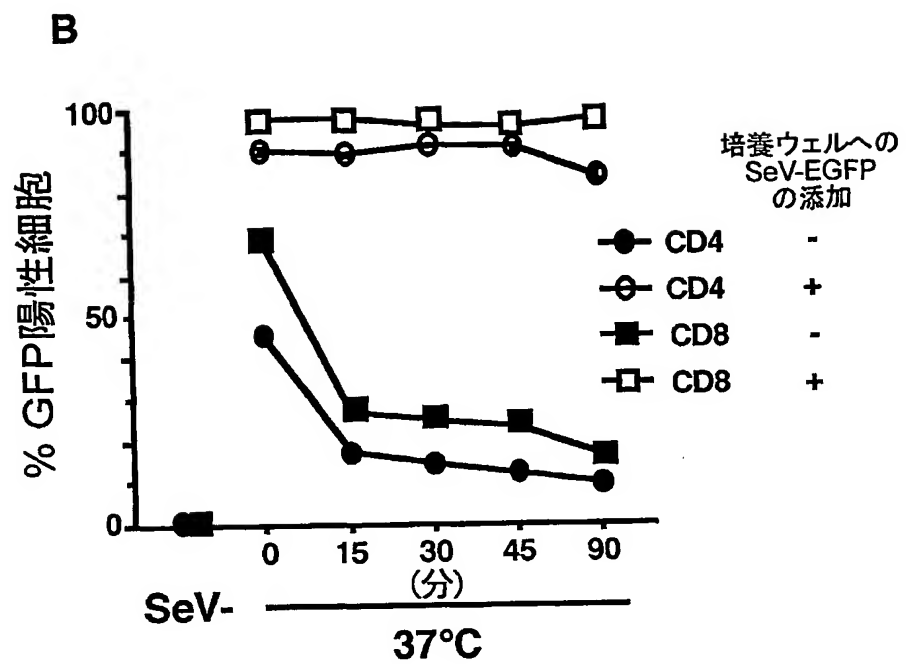
9/10

図 9



10/10

図10



SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> Method for transducing a gene into T cells

<130> D3-A0205P

<140>

<141>

<150> JP 2002-310053

<151> 2002-10-24

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 1

ctttcaccct

10

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 2

tttttcttac tacgg

15

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 3

cggccgcaga tcttcacg

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 4

atgcatgccg gcagatga

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 5

gttgagtact gcaagagc

18

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 6

tttgccggca tgcattttc ccaaggggag agttttgcaa cc

42

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 7

atgcatgccg gcagatga

18

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 8

tgggtgaatg agagaatcag c

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/86, C12N5/10, C12N7/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/86, C12N5/10, C12N7/01

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG),
JSTPLUS FILE (JOIS), SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAKAI Y. et al., Accomodation of foreign genes into the Sendai virus genome: sizes of inserted genes and viral replication., FEBS Letters, 1999, Vol.456, pages 221 to 226	6, 7
P, X	OKANO S. et al., Recombinant Sendai virus vectors for activated T lymphocytes., Gene Therapy, 2003, Vol.10, No.16, pages 1381 to 1391	1-7
A	IKEDA Y. et al., Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer into adult rat retinal tissue: Efficient gene transfer by brief exposure., Experimental Eye Research, July 2002, Vol.75, No.1, pages 39 to 48	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
08 December, 2003 (08.12.03)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2003 (24.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13476

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHIOTANI A. et al., Skeltal muscle regeneration after insulin-like growth factor I gene transfer by recombinant Sendai virus vector., Gene Therapy, 2001, Vol.8, No.14, pages 1043 to 1050	1-7
A	YONEMITSU Y. et al., Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus., Nature Biotechnology, 2000, Vol.18, No.9, pages 970 to 973	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/86, C12N5/10, C12N7/01

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/86, C12N5/10, C12N7/01

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPLUSファイル (JOIS)

SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SAKAI Y. et al., Accomodation of foreign genes into the Sendai virus genome: sizes of inserted genes and viral replication., FEBS Letters, 1999, Vol. 456, p. 221-226	6, 7
P, X	OKANO S: et al., Recombinant Sendai virus vectors for activated T lymphocytes., Gene Therapy, 2003, Vol. 10, No. 16, p. 1381-1391	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 12. 03

国際調査報告の発送日

24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4B 3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	IKEDA Y. et al., Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer into adult rat retinal tissue: Efficient gene transfer by brief exposure., Experimental Eye Research, July 2002, Vol.75, No.1, p.39-48	1-7
A	SHIOTANI A. et al., Skeletal muscle regeneration after insulin-like growth factor I gene transfer by recombinant Sendai virus vector., Gene Therapy, 2001, Vol.8, No.14, p.1043-1050	1-7
A	YONEMITSU Y. et al., Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus., Nature Biotechnology, 2000, Vol.18, No.9, p.970-973	1-7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DESCRIPTION

METHODS OF TRANSDUCING GENES INTO T CELLS

5 Technical Field

The present invention relates to methods of transducing genes into T cells.

Background Art

10 Genetic modification of hematopoietic cells is an attractive strategy for treating autoimmune diseases, immunodeficiencies, as well as tumors via the activation of antitumor immunity. Among the various blood cells, T lymphocytes have been a target for gene delivery since the early stage of ADA-SCID (severe combined immunodeficiency disease due to adenosine deaminase deficiency) gene therapy (Blaese, R.M. *et al.*, Science, 1995, 270: 475-480; Altenschmidt, U. *et al.*, J. Mol. Med., 1997, 75: 259-266; Misaki, Y. *et al.*, Mol. Ther., 15 2001, 3: 24-27). However, T cells are relatively resistant to gene delivery using presently available vectors such as retroviruses, which has currently become an obstacle for gene delivery.

Considering clinical settings in treating autoimmune diseases, rejection following organ allo-transplantation, tumors, or such, subsets of activated T lymphocytes are evidently ideal targets for genetic modification (Altenschmidt, U. *et al.*, J. Mol. Med., 1997, 75: 259-266; Hege, 20 K.M. and Roberts, M.R., Curr. Opin. Biotechnol., 1996, 7: 629-634; Tuohy, V.K. *et al.*, J. Neuroimmunol., 2000, 107: 226-232). Early clinical reports on gene marking proved that tumor infiltrating lymphocytes (TILs), which are activated by tumor antigens, migrate to tumors in tumor-bearing individuals, suggesting that TILs are an ideal carrier vehicle for delivering therapeutic genes into tumors (Rosenberg, S.A. *et al.*, N. Engl. J. Med., 1990, 323: 570-578). 25 Similar characteristics are expected of activated T lymphocytes in autoimmunity and organ transplantation. However, very little of such research has been performed in the past 10 years presumably because of the low efficiency of gene delivery into activated T cells by the presently available vectors.

Recently, a newly discovered vehicle for gene delivery into T lymphocytes, namely the 30 human immunodeficiency virus (HIV)-based lentiviral vector, has received considerable attention because of its CD4 lymphocyte-directed HIV tropism. As a result of efforts made in the recent years, efficiency of HIV gene delivery into activated T cells has been dramatically improved through the construction of a central DNA flap, which promotes the import of vector genome into the nucleus and its integration into chromosomes on an average of 51% versus the 35 15% achieved by using a conventional HIV vector (Dardalhon, V. *et al.*, Gene Ther., 2001, 8: 190-198). However, in the case of lentiviral vectors based on pathogenic viruses including HIV

THIS PAGE BLANK (USPTO)

in particular, potential safety concerns have delayed their clinical applications (Buchsachner, G.L. Jr. and Wong-Staal, F., Blood 2000, 95: 2499-2504). Continuous efforts are unquestionably necessary for developing safer alternatives that allow more efficient gene delivery into T cells.

5

Disclosure of the Invention

To search for vectors that can efficiently transduce genes into T cells, vectors were transferred into T cells under various conditions and gene transfer efficiency was measured. As a result, the present inventors discovered that paramyxovirus vectors have a high gene transduction efficiency towards antigen-activated T cells. The gene transduction was specific to antigen-activated T cells, that is, the vectors' gene transduction efficiency towards activated T cells was remarkably higher compared to naive T cells. Paramyxovirus vectors can be preferably used as vectors for gene transduction into antigen-activated T cells.

Although T lymphocyte-directed gene therapy presents a possibility for treating various immunological diseases, the low efficiency of gene transduction despite the necessity to perform complicated procedures has been a major constraint in T cell-directed gene therapy thus far. The present invention has proved that paramyxovirus vectors can be made to specifically express a foreign gene in activated T cells using a very simple procedure, and therefore has overcome the above-described problems of T cell-directed gene therapy. As a result of the present invention, gene transduction specific to activated T cells has become possible. Therefore, the present invention is expected to be applied in immunological modification strategies using T cell-directed gene delivery in immune diseases.

That is, the present invention relates to methods of transducing genes into T cells, more specifically to:

- (1) a method for transducing a gene into T cells, wherein said method comprises the step of contacting a paramyxovirus vector carrying the gene with activated T cells;
- (2) the method according to (1), wherein the paramyxovirus vector is a Sendai virus vector;
- (3) a method of preparing T cells transduced with a foreign gene, wherein said method comprises the step of contacting a paramyxovirus vector carrying said gene with activated T cells;
- (4) the method according to (3), wherein the paramyxovirus vector is a Sendai virus vector;
- (5) a T cell transduced with a foreign gene prepared by the method according to (3) or (4);
- (6) a paramyxovirus vector to be used in gene transduction into activated T cells; and,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(7) the vector according to (6), wherein the paramyxovirus vector is a Sendai virus vector.

The present invention provides a method for transducing a gene into T cells using a paramyxovirus vector, comprising the step of contacting a paramyxovirus vector carrying a gene to be transduced with activated T cells. The present inventors discovered that this paramyxovirus vector is capable of transducing a gene into activated T cells with an extremely high efficiency. The low gene transduction efficiency of the paramyxovirus vector towards naive T cells indicates that gene transduction by this vector is specific to antigen-activated T cells. Therefore, the method of this invention can be preferably utilized to selectively transduce genes into activated T cells. T cells are important as targets for controlling the immune system in treating cancer and other diseases, and the method of this invention can be suitably used in gene therapy for these diseases. Gene transduction can be performed in any desired physiological aqueous solutions such as culture media, physiological saline, blood, and body fluids.

Further, this invention provides a method for transducing a desired gene into T cells, which comprises the steps of: (a) activating T cells, and (b) contacting the activated T cells with a paramyxovirus vector carrying a desired gene. This method is also included in the present invention's methods of transducing a gene into T cells. T cells can be activated by antigen stimulation. The step of activating T cells enables efficient gene transduction by paramyxovirus vectors. T cell activation may be performed in the presence of a paramyxovirus vector or prior to contacting a paramyxovirus vector with these T cells.

One important advantage of T cell-targeted gene delivery via paramyxovirus vectors is that it allows highly efficient gene transduction with a simple technique. As previously reported, gene delivery into T cells using retroviruses and lentiviruses requires that the lymphocytes be concentrated by centrifugation for optimum gene delivery, and also requires the use of toxic drugs such as polybrene (Bunnell, B.A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1995, 92: 7739-7743; Chuck, A.S., Hum. Gene Ther., 1996, 7: 743-750; Chinnasamy, D. *et al.*, Blood 2000, 96: 1309-1316; Fehse, B. *et al.*, Br. J. Haematol., 1998, 102: 566-574). On the other hand, paramyxoviral solutions could achieve superior gene transduction, requiring only a simple addition without the help of any special drugs. Further, similarly to the typical results observed with nasal mucosa (Yonemitsu, Y. *et al.*, Nat. Biotechnol., 2000, 18: 970-973), vasculature (Masaki, I. *et al.*, FASEB J., 2001, 15: 1294-1296), retinal tissue (Ikeda, Y. *et al.*, Exp. Eye Res., 2002, 75: 39-48), and such, optimum gene delivery into activated T cells via Sendai virus vector (SeV) could be performed by a relatively short exposure of T cells (less than 30 min, data not shown). From a clinical point of view, these characteristics of paramyxovirus vector-mediated gene delivery can simplify the *ex vivo* genetic modification of T lymphocytes in this

THIS PAGE BLANK (USPTO)

invention and minimize loss of cell viability in the process.

The present inventors discovered that *in vitro*, the lower the cell density of human lymphocytes, the lower the ratio of gene-transduced cells, and observed the same result with murine cells. Therefore, the cell density for gene transduction in the present invention is preferably relatively high. A cell density in the range of approximately, for example, 1×10^6 /ml to 4×10^6 /ml, preferably 4×10^6 /ml to 8×10^6 /ml, more preferably 8×10^6 /ml to 1×10^7 /ml, is appropriate.

The vector is administered at an MOI (multiplicity of infection) in the range of preferably 1 to 500, more preferably 2 to 300, and even more preferably 3 to 200. Short contact of the vector with T cells, for example, 1 minute or longer, preferably 3 minutes or longer, 5 minutes or longer, or 10 minutes or longer, is sufficient. Alternatively, the contact time may be 20 minutes or longer, for example, approximately 1 to 60 minutes, more specifically 5 to 30 minutes. Needless to say, the contact can be longer than this, such as several days or longer.

Recently, sufficient numbers of T cell clones can be easily prepared using several refined and efficient techniques, including the universal artificial antigen-presenting cell (APC) system which is capable of stimulating T cells with anti-CD3 and anti-CD28, as well as 4-1BB ligand using immunological synapses (Maus, M.V. *et al.*, Nat. Biotechnol., 2002, 20: 143-148). By combining such techniques, the vector system derived from SeV would have a significant therapeutic potential in the clinical applications of T cell-directed gene therapy against various immunological disorders.

This invention also provides a method of selectively transducing a gene into activated T cells, comprising the step of allowing a paramyxovirus vector carrying a gene to coexist with a cell population containing activated and naive T cells. "Selectively transducing a gene into activated T cells" means that an activated T cell has been significantly transduced compared to naive T cells. For example, this invention provides a method comprising the step of adding a paramyxovirus vector carrying the gene to a cell population containing activated and naive T cells. Since the paramyxovirus vector transduces a gene into activated T cells preferentially over naive T cells, this method enables selective gene transduction into activated T cells. Alternatively, a vector can be selectively transduced into activated T cells by allowing T cells to coexist with the vector and then activating these T cells through treatments. These methods are also included in the method of transducing a gene into T cells in this invention.

T cells, also referred to as T lymphocytes, express T cell receptors which recognize the antigen peptide complex presented by the major histocompatibility complex (MHC). Mainly, T cells differentiate from bone marrow stem cells, undergo positive selection (selection of T cell repertoires that recognize self MHC) and negative selection (elimination of T cell repertoires that recognize self antigens) in the thymus, and appear as mature naive T cells in the peripheral

THIS PAGE BLANK (USPTO)

blood and lymphoid tissues. T cells are major lymphocytes that recognize peptides derived from protein antigens, tumor antigens, allo-antigens, pathogens, and others and generate antigen-specific immune response (adaptive immunity) in individuals. T cells assist in the production of antibodies against these peptides (humoral immunity) or induce cellular immunity by becoming armed T cells themselves.

Activated T cells refer to T lymphocytes that are in such a state that proliferation/differentiation is induced when stimulated by antigens, mitogens, etc. In brief, activated T cells refer to T cells that undergo DNA synthesis, cell division, and proliferation/differentiation as a result of intracellular tyrosine kinase activation by T cell receptor binding or direct enzyme activation, which is followed by acceleration of inositol phospholipid metabolism and increase in intracellular calcium concentration, production of interleukin (IL)-2 and expression of IL-2 receptor, as well as generation of additional cellular signals. Various cytokines are produced from various types of differentiated T cells depending on the biological environment at the time of T cell activation.

Further, activated T cells in this invention are preferably T cells activated by antigens. Gene transduction via Sendai virus vectors is selective for antigen-activated T cells. Transduction efficiency is low in the case of antigen-nonspecific T cells, which are bystander-activated from specific T cells that have responded to antigens *ex vivo*. Therefore, vector-mediated gene transduction efficiency can be dramatically improved by activating T cells with antigens, or by performing an equivalent activation.

Antigen-activated T cells refer to T cells that have receptors with an appropriate affinity for the above-described complexes of the antigen-presenting cells' MHC with peptides or such derived from a specific antigen, and that transduce activation signals via the binding of the receptors to the complexes. Preferably, antigen-activated T cells refer to T cells activated by signal transduction via appropriate co-receptors such as CD28 and 4-1BB. Preferably, antigen-activated T cells are capable of proliferation, blast formation, production of various cytokines such as IL-2, IL-4, and IFN- γ , expression of cytotoxic molecules such as Fas Ligand and perforin, activation of antigen (such as CD40-ligand)-presenting cells and/or B cells, and so on. Antigen-specific T cells activate antigen-presenting cells and/or B cells and stimulate antibody production in lymph nodes and such, under the presence of MHC and antigen-presenting cells which presents the peptide. In localized peripheral tissues, antigen-specific T cells have the major function of excluding non-self proteins, non-self cells, and pathogens from the living body through actions such as induction of cytotoxicity and inflammation due to generated cytokines and cytotoxic molecules.

Activated T cells can be prepared by fractionation. For example, activated T cells can be separated from naive T cells based on the characteristic that human T cells alter the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

expression pattern of CD antigens upon activation. A specific method involves collecting T cells through negative selection, and sorting with an antibody against CD45RO exposed on activated T cells by using the magnetic bead separation method or flow cytometry. CD45RA+ and CD62L+ double-positive T cells are naive T cells, and the rest is considered either activated or memory T cells. Therefore, antibodies against both CD45RA and CD62L can be preferably used to sort and obtain fractions of activated T cells or naive T cells, by using the magnetic bead separation method or flow cytometry. Antibodies used in fractionation can be used in all methods that employ combinations of known markers associated with T cell activation. Further, the method of fractionating activated T cells into populations with specialized functions, such as those with chemokine receptors or cytokine receptors, is also included in this invention. Fractionation methods also include known methods such as those that use relative densities.

Activated T cells can also be prepared by activating naive T cells through antigenic stimulation. For example, naive T cells can be activated by culturing them in a plate having immobilized anti-CD3 antibody (10 µg/ml) and anti-CD28 antibody (10 µg/ml) at the concentrations described below, preferably with the simultaneous addition of mature dendritic cells differentiated from peripheral blood monocytes. Further, as described in the section of activation by tumor antigen, naive T cells can also be activated in cultures supplied with dendritic cells and peptides or protein antigens.

For example, when a human alloantigen is used, antigen-activated T cells can be prepared by: collecting peripheral blood samples from a donor and a recipient; separating lymphocytes from each sample using a peripheral blood lymphocyte separation solution; adjusting the lymphocyte suspensions to a concentration of 1×10^7 cells/ml; pipetting the recipient cell suspension and 30 Gy-irradiated donor-derived cell suspension (500 µl each) into each well of a 24-well plate; and culturing in the presence of human IL-2 (5 to 100 U/ml) for about 7 days. Subcultures can be re-stimulated every 7 days with irradiated donor lymphocytes. An antigen-specific T cell line is preferably one that has undergone antigen stimulation at least three times (including the first one). Alternatively, T cells which have been stimulated to proliferate after a second antigen stimulation using, for example, beads or cells having immobilized anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, are also included in the antigen-activated T cells.

T cells activated by tumor antigens and such can be obtained by subjecting tumor cells to quick freeze-thawing (four cycles or more), adding the cell lysates to dendritic cells differentiated from peripheral blood, using these cells as antigen-presenting cells following exposure to radiation of 20 to 30 Gy, co-culturing these antigen-presenting cells and T cells separated from peripheral blood, in the presence of IL-2 (5 to 100 U/ml) alone or with additional optimal cytokines such as IL-7 for 7 days, and re-stimulating thrice every 7 days (Fields, R.C. *et*

THIS PAGE BLANK (USPTO)

al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 9482-9487). Dendritic cells used herein include all of those obtained by known methods that use cytokines such as GM-CSF and IL-4 for the proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells, such as peripheral blood monocytes, bone marrow, umbilical cord blood and mobilized peripheral blood.

5 Peripheral blood T cells may be separated using a T cell separation solution. When the effective peptide portion of an antigen is known, T cells may be obtained using methods for separating antigen-specific T cells via peptide complexes with Class I or Class II tetramers.

10 Apart from the above-described methods, when the specific antigen is known, activated T cells can also be prepared by activation methods using the antigen, or a peptide or protein derived from the antigen. Known methods for activating T cells such as the non-specific activation method using lectins or the like can also be used to prepare activated T cells. Antigen-activated T cells in this invention also include these T cells thus obtained.

15 These activated T cells can be passaged by co-culturing with appropriate growth factors, cytokines and antigens, and antigen-presenting cells (including feeder cells, differentiated dendritic cells, or artificial APC), or with antigen presenting cells that do not present any antigens, and such. Other passage methods appropriate for the disorder that is treated may also be used. For example, in the case of transfer immunotherapy for infection immunity and such, T cells produce various cytokines in the midst of an antigen activation, and therefore, side effects such as fever are likely to occur upon entry of the T cells into a living body. Further, T cells
20 used to transfer immunity must express their functions only at the time of infection. Therefore, there are a methods that prepare resting activated T cells (so-called memory T cells) by transducing a gene into antigen-activated T cells using a paramyxovirus vector, and then co-culturing with APC in the absence of the antigen.

25 In this invention, the paramyxovirus vector is a paramyxovirus-based virion with infectivity and a vehicle for transducing genes into cells. Herein, "infectivity" refers to the capability of a paramyxovirus vector to maintain cell-adhesion ability and transduce a gene carried by the vector to the inside of the cell to which the vector has adhered. In a preferable embodiment, the paramyxovirus vector of this invention has a foreign gene incorporated into its genomic RNA for expression. The paramyxovirus vector of this invention may have replication
30 ability or may be a defective-type vector with no replication ability. "Having replication ability" means that when a viral vector infects a host cell, the virus is replicated in the cell to produce infectious virions.

"Recombinant virus" refers to a virus produced through a recombinant polynucleotide. "Recombinant polynucleotide" refers to a polynucleotide in which nucleotides are not linked at
35 one or both ends as in the natural condition. Specifically, a recombinant polynucleotide is a polynucleotide in which the linkage of the polynucleotide chain has been artificially modified

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(cleaved and/or linked). Recombinant polynucleotides can be produced by using gene recombination methods known in the art in combination with polynucleotide synthesis, nuclease treatment, ligase treatment, etc. A recombinant virus can be produced by expressing a polynucleotide encoding a viral genome constructed through gene manipulation and reconstructing the virus. For example, recombinant paramyxovirus can be produced by reconstruction from cDNA (Y. Nagai, A. Kato, Microbiol. Immunol., 43, 613-624 (1999)).

In the present invention, "gene" refers to a genetic substance, a nucleic acid encoding a transcription unit. Genes may be RNAs or DNAs. In this invention, a nucleic acid encoding a protein is referred to as a gene of that protein. Further, a gene may not encode a protein. For example, a gene may encode a functional RNA, such as a ribozyme or antisense RNA. A gene may be a naturally-occurring or artificially designed sequence. Furthermore, in the present invention, "DNA" includes both single-stranded and double-stranded DNAs. Moreover, "encoding a protein" means that a polynucleotide comprises an ORF that encodes an amino acid sequence of the protein in a sense or antisense strand, so that the protein can be expressed under appropriate conditions.

In this invention, "paramyxovirus" refers to a virus belonging to Paramyxoviridae, or to derivatives thereof. Paramyxoviruses are a group of viruses with non-segmented negative strand RNA as their genome, and include Paramyxovirinae (including *Respirovirus* (also referred to as *Paramyxovirus*), *Rubulavirus*, and *Morbillivirus*), and Pneumovirinae virus (including *Pneumovirus* and *Metapneumovirus*). Specific examples of *Paramyxovirus* applicable to the present invention are the Sendai virus, Newcastle disease virus, mumps virus, measles virus, respiratory syncytial virus (RS virus), rinderpest virus, distemper virus, simian parainfluenza virus (SV5), and human parainfluenza viruses 1, 2, and 3. More specifically, such examples include Sendai virus (SeV), human parainfluenza virus-1 (HPIV-1), human parainfluenza virus-3 (HPIV-3), phocine distemper virus (PDV), canine distemper virus (CDV), dolphin morbillivirus (DMV), peste-des-petits-ruminants virus (PDPR), measles virus (MV), rinderpest virus (RPV), Hendra virus (Hendra), Nipah virus (Nipah), human parainfluenza virus-2 (HPIV-2), simian parainfluenza virus 5 (SV5), human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a), human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b), mumps virus (Mumps), and Newcastle disease virus (NDV). A more preferred example is a virus selected from the group consisting of Sendai virus (SeV), human parainfluenza virus-1 (HPIV-1), human parainfluenza virus-3 (HPIV-3), phocine distemper virus (PDV), canine distemper virus (CDV), dolphin morbillivirus (DMV), peste-des-petits-ruminants virus (PDPR), measles virus (MV), rinderpest virus (RPV), Hendra virus (Hendra), and Nipah virus (Nipah). Viruses of this invention are preferably those belonging to Paramyxovirinae (including *Respirovirus*, *Rubulavirus*, and *Morbillivirus*) or derivatives thereof, and more preferably those belonging to the genus *Respirovirus* (also referred to as *Paramyxovirus*) or

THIS PAGE BLANK (USPTO)

derivatives thereof. Examples of viruses of the genus *Respirovirus* applicable to this invention are human parainfluenza virus-1 (HPIV-1), human parainfluenza virus-3 (HPIV-3), bovine parainfluenza virus-3 (BPIV-3), Sendai virus (also referred to as murine parainfluenza virus-1), and simian parainfluenza virus-10 (SPIV-10). The most preferred paramyxovirus in this invention is the Sendai virus. These viruses may be derived from natural strains, wild strains, mutant strains, laboratory-passaged strains, artificially constructed strains, or the like.

Genes harbored on a paramyxovirus vector are situated in the antisense direction in the genomic RNA. Genomic RNA refers to RNA that has the function to form a ribonucleoprotein (RNP) with the viral proteins of a paramyxovirus. Genes contained in the genome are expressed by the RNP, genomic RNA is replicated, and daughter RNPs are formed. In general, the genome of a paramyxovirus is constituted so that the viral genes are situated in an antisense orientation between the 3'-leader region and 5'-trailer region. Between the ORFs of individual genes exists a transcription ending sequence (E sequence) – intervening sequence (I sequence) – transcription starting sequence (S sequence) that allows the RNA encoding each ORF to be transcribed as a separate cistron.

Genes encoding the viral proteins of a paramyxovirus include NP, P, M, F, HN, and L genes. “NP, P, M, F, HN, and L genes” refer to genes encoding nucleocapside-, phospho-, matrix-, fusion-, hemagglutinin-neuraminidase-, and large-proteins respectively. Genes in each virus belonging to Paramyxovirinae are commonly listed as follows. In general, NP gene is also listed as “N gene.”

Respirovirus...NP...P/C/V...M...F...HN.....L
Rubulavirus...NP...P/V.....M...F...HN...(SH)...L
Morbillivirus...NP...P/C/V...M...F...H.....L

For example, the database accession numbers for the nucleotide sequences of each of the Sendai virus genes are: M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, and X17218 for NP gene; M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, and X17008 for P gene; D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, and X53056 for M gene; D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, and X02131 for F gene; D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, and X56131 for HN gene; and D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, and X58886 for L gene. Examples of viral genes encoded by other viruses are: CDV, AF014953; DMV, X75961; HPIV-1, D01070; HPIV-2, M55320; HPIV-3, D10025; Mapuera, X85128; Mumps, D86172; MV, K01711; NDV, AF064091; PDPR, X74443; PDV, X75717; RPV, X68311; SeV, X00087; SV5, M81442; and Tupaia, AF079780 for N gene; CDV,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

X51869; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, X04721; HPIV-4a, M55975; HPIV-4b, M55976; Mumps, D86173; MV, M89920; NDV, M20302; PDV, X75960; RPV, X68311; SeV, M30202; SV5, AF052755; and Tupaia, AF079780 for P gene; CDV, AF014953; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, D00047; MV, ABO16162; RPV, X68311; SeV, AB005796; and
 5 Tupaia, AF079780 for C gene; CDV, M12669; DMV, Z30087; HPIV-1, S38067; HPIV-2, M62734; HPIV-3, D00130; HPIV-4a, D10241; HPIV-4b, D10242; Mumps, D86171; MV, AB012948; NDV, AF089819; PDPR, Z47977; PDV, X75717; RPV, M34018; SeV, U31956; and SV5, M32248 for M gene; CDV, M21849; DMV, AJ224704; HPN-1, M22347; HPIV-2, M60182; HPIV-3, X05303; HPIV-4a, D49821; HPIV-4b, D49822; Mumps, D86169; MV,
 10 AB003178; NDV, AF048763; PDPR, Z37017; PDV, AJ224706; RPV, M21514; SeV, D17334; and SV5, AB021962 for F gene; and, CDV, AF112189; DMV, AJ224705; HPIV-1, U709498; HPIV-2, D000865; HPIV-3, AB012132; HPIV-4A, M34033; HPIV-4B, AB006954; Mumps, X99040; MV, K01711; NDV, AF204872; PDPR, Z81358; PDV, Z36979; RPV, AF132934; SeV, U06433; and SV-5, S76876 for HN (H or G) gene. However, a number of strains are known for
 15 each virus, and genes exist that comprise sequences other than those cited above, due to strains differences.

The ORFs encoding these viral proteins and ORFs of the foreign genes are arranged in the antisense direction in the genomic RNAs, via the above-described E-I-S sequence. The ORF closest to the 3'-end of the genomic RNAs only requires an S sequence between the 3'-leader
 20 region and the ORF, and does not require an E or I sequence. Further, the ORF closest to the 5'-end of the genomic RNA only requires an E sequence between the 5'-trailer region and the ORF, and does not require an I or S sequence. Furthermore, two ORFs can be transcribed as a single cistron, for example, by using an internal ribosome entry site (IRES) sequence. In such a case, an E-I-S sequence is not required between these two ORFs. In wild type paramyxoviruses, a
 25 typical RNA genome comprises a 3'-leader region, six ORFs encoding the N, P, M, F, HN, and L proteins in the antisense direction and in this order, and a 5'-trailer region on the other end. The viral gene orientation in the genomic RNAs of this invention are not restricted, but similarly to the wild type viruses, it is preferable that ORFs encoding the N, P, M, F, HN, and L proteins are arranged in this order, after the 3'-leader region, and before the 5'-trailer region. Certain types
 30 of paramyxoviruses have different viral genes, but even in such cases, it is preferable that each gene be arranged as in the wild type, as described above. In general, vectors maintaining the N, P, and L genes can autonomously express genes from the RNA genome in cells, replicating the genomic RNA. Furthermore, by the action of genes such as the F and HN genes, which encode envelope proteins, and the M gene, infectious virions are formed and released to the outside of
 35 cells. Thus, such vectors become viral vectors with replication ability. A foreign gene to be

THIS PAGE BLANK (USPTO)

transduced into T cells may be inserted into a protein-noncoding region in this genome, as described below.

Further, a paramyxovirus vector of this invention may be deficient in any of the wild type paramyxovirus genes. For example, a paramyxovirus vector that does not comprise the M, F, or HN gene, or any combinations thereof, can be preferably used as a paramyxovirus vector of this invention. Such viral vectors can be reconstituted, for example, by externally supplying the products of the deficient genes. Similar to wild type viruses, the viral vectors thus prepared adhere to host cells and cause cell fusion, but they cannot form daughter virions that comprise the same infectivity as the original vector, because the vector genome introduced into cells is deficient in viral genes. Therefore, such vectors are useful as safe viral vectors that can only introduce genes once. Examples of genes that the genome may be deficient in are the F gene and/or HN gene. For example, viral vectors can be reconstituted by transfecting host cells with a plasmid expressing a recombinant paramyxovirus vector genome deficient in the F gene, along with an F protein expression vector and expression vectors for the NP, P, and L proteins (WO00/70055 and WO00/70070; Li, H.-O. *et al.*, J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000)). Viruses can also be produced, for example, by using host cells that have incorporated the F gene into their chromosomes. In these proteins, their amino acid sequences do not need to be the same as the viral sequences, and a mutant or homologous gene from another virus may be used as a substitute, as long as their activity in nucleic acid introduction is the same as, or greater than, that of the natural type.

Further, vectors that comprise an envelope protein other than that of the virus from which the vector genome was derived, may be prepared as viral vectors of this invention. For example, when reconstituting a virus, a viral vector comprising a desired envelope protein can be generated by expressing an envelope protein other than the envelope protein encoded by the basic viral genome. Such proteins are not particularly limited, and include the envelope proteins of other viruses, for example, the G protein of vesicular stomatitis virus (VSV-G). The viral vectors of this invention include pseudotype viral vectors comprising envelope proteins, such as VSV-G, derived from viruses other than the virus from which the genome was derived. If the viral vectors are designed such that these envelope proteins are not encoded in RNA genomes, the proteins will never be expressed after virion infection of the cells.

Furthermore, the viral vectors of this invention may be, for example, vectors comprising on the envelope surface thereof, proteins such as adhesion factors capable of adhering to specific cells, ligands, receptors, antibodies or fragments, or vectors comprising a chimeric protein with these proteins in the extracellular domain and polypeptides derived from the virus envelope in the intracellular domain. Thus, the T cell specificity of the vectors can be controlled. These proteins may be encoded in the viral genome, or supplied through the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

expression of genes not in the viral genome (for example, genes carried by other expression vectors, or genes in the host chromosomes) at the time of viral vector reconstitution.

Further, in the vectors of this invention, any viral gene comprised in the vector may be modified from the wild type gene in order to reduce the immunogenicity caused by viral proteins, or to enhance RNA transcriptional or replicational efficiency, for example. Specifically, for example, in a paramyxovirus vector, modifying at least one of the replication factors N, P, and L genes, is considered to enhance transcriptional or replicational function. Furthermore, although the HN protein, which is an envelope protein, comprises both hemagglutinin activity and neuraminidase activity, it is possible, for example, to improve viral stability in blood if the former activity can be attenuated, and infectivity can be controlled if the latter activity is modified. Further, it is also possible to control membrane fusion ability by modifying the F protein. For example, the epitopes of the F protein or HN protein, which can be cell surface antigenic molecules, can be analyzed, and using this, viral vectors with reduced antigenicity to these proteins can be prepared.

Furthermore, vectors of this invention may be deficient in accessory genes. For example, by knocking out the V gene, one of the SeV accessory genes, the pathogenicity of SeV toward hosts such as mice is remarkably reduced, without hindering gene expression and replication in cultured cells (Kato, A. *et al.*, 1997, J. Virol. 71: 7266-7272; Kato, A. *et al.*, 1997, EMBO J. 16: 578-587; Curran, J. *et al.*, WO01/04272, EP1067179). Such attenuated vectors are particularly useful as nontoxic viral vectors for *in vivo* or *ex vivo* gene transfer.

Paramyxoviruses are excellent gene transfer vectors. They do not have DNA phase and carry out transcription and replication only in the host cytoplasm, and consequently, chromosomal integration does not occur (Lamb, R.A. and Kolakofsky, D., Paramyxoviridae: The viruses and their replication. *In*: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields of Virology. Vol. 2. Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, 1996, pp. 1177-1204). Therefore, safety issues such as transformation and immortalization due to chromosomal aberration do not occur. This paramyxovirus characteristic contributes greatly to safety when it is used as a vector. For example, results on foreign gene expression show that even after multiple continuous passages of SeV, almost no nucleotide mutation is observed. This suggests that the viral genome is highly stable and the inserted foreign genes are stably expressed over long periods of time (Yu, D. *et al.*, Genes Cells 2, 457-466 (1997)). Further, there are qualitative advantages associated with SeV not having a capsid structural protein, such as packaging flexibility and insert gene size, suggesting that paramyxovirus vectors may become a novel class of highly efficient vectors for human gene therapy. SeV vectors with replication ability are capable of introducing foreign genes of up to at least 4 kb in size, and can simultaneously express two or more kinds of genes by adding the transcriptional units.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Further, SeV is known to be pathogenic in rodents causing pneumonia, but is not pathogenic for human. This is also supported by a previous report that nasal administration of wild type SeV does not have severely harmful effects on non-human primates (Hurwitz, J.L. *et al.*, Vaccine 15: 533-540, 1997). These SeV characteristics suggest that SeV vectors can be applied therapeutically on humans, supporting the fact that SeV vectors are a promising choice of gene therapy that targets human T cells.

Viral vectors of this invention are capable of encoding foreign genes in their genomic RNA. A recombinant paramyxovirus vector harboring a foreign gene is obtained by inserting a foreign gene into an above-described paramyxovirus vector genome. The foreign gene can be any desired gene that needs to be expressed in a target T cell, and may be a gene that encodes a naturally-occurring protein, or protein modified from a naturally-occurring protein by deletion, substitution, or insertion of amino acid residues. The foreign gene can be inserted at any desired position in a protein-noncoding region of the virus genome, for example. The above nucleic acid can be inserted, for example, between the 3'-leader region and the viral protein ORF closest to the 3'-end; between each of the viral protein ORFs; and/or between the viral protein ORF closest to the 5'-end and the 5'-trailer region in genomic DNA. Further, in genomes deficient in the F or HN gene or the like, nucleic acids encoding the foreign genes can be inserted into those deficient regions. When introducing a foreign gene into a paramyxovirus, it is desirable to insert the gene such that the chain length of the polynucleotide to be inserted into the genome will be a multiple of six (Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 4822-4830, 1993). An E-I-S sequence should be arranged between the inserted foreign gene and the viral ORF. Two or more genes can be inserted in tandem via E-I-S sequences.

Expression levels of a foreign gene carried in a vector can be controlled using the type of transcriptional initiation sequence added upstream (to the 3'-side of the negative strand) of the gene (WO01/18223). The expression levels can also be controlled by the position at which the foreign gene is inserted in the genome: the nearer to the 3'-end of the negative strand the insertion position is, the higher the expression level; while the nearer to the 5'-end the insertion position is, the lower the expression level. Thus, to obtain a desired gene expression level, the insertion position of a foreign gene can be appropriately controlled such that the combination with genes encoding the viral proteins before and after the foreign gene is most suitable. In general, since a high foreign gene expression level is thought to be advantageous, it is preferable to link the foreign gene to a highly efficient transcriptional initiation sequence, and to insert it near the 3'-end of the negative strand genome. Specifically, a foreign gene is inserted between the 3'-leader region and the viral protein ORF closest to the 3'-end. Alternatively, a foreign gene may be inserted between the ORFs of the viral gene closest to the 3'-end and the second closest viral gene. In wild type paramyxoviruses, the viral protein gene closest to the 3'-end of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

the genome is the N gene, and the second closest gene is the P gene. Alternatively, when a high level of expression of the introduced gene is undesirable, the gene expression level from the viral vector can be suppressed to obtain an appropriate effect, for example, by inserting the foreign gene at a site in the vector as close as possible to the 5'-side of the negative strand, or by selecting an inefficient transcriptional initiation sequence.

To prepare a vector of the present invention, a cDNA encoding a genomic RNA of a paramyxovirus is transcribed in mammalian cells, in the presence of viral proteins (i.e., N, P, and L proteins) essential for reconstitution of an RNP, which is a component of a paramyxovirus. Viral RNP can be reconstituted by producing either the negative strand genome (that is, the same antisense strand as the viral genome) or the positive strand (the sense strand encoding the viral proteins). Production of the positive strand is preferable for increased efficiency of vector reconstitution. The RNA terminals preferably reflect the terminals of the 3'-leader sequence and 5'-trailer sequence as accurately as possible, as in the natural viral genome. To accurately regulate the 5'-end of the transcript, for example, the RNA polymerase may be expressed within a cell using the recognition sequence of T7 RNA polymerase as a transcription initiation site. To regulate the 3'-end of the transcript, for example, a self-cleaving ribozyme can be encoded at the 3'-end of the transcript, allowing accurate cleavage of the 3'-end with this ribozyme (Hasan, M. K. *et al.*, J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. *et al.*, 1997, EMBO J. 16: 578-587; and Yu, D. *et al.*, 1997, Genes Cells 2: 457-466).

For example, a recombinant Sendai virus vector carrying a foreign gene can be constructed as follows, according to descriptions in: Hasan, M. K. *et al.*, J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. *et al.*, 1997, EMBO J. 16: 578-587; Yu, D. *et al.*, 1997, Genes Cells 2: 457-466; or the like.

First, a DNA sample comprising a cDNA sequence of an objective foreign gene is prepared. The DNA sample is preferably one that can be confirmed to be a single plasmid by electrophoresis at a concentration of 25 ng/ μ l or more. The following explains the case of using a *Not* I site to insert a foreign gene into a DNA encoding a viral genomic RNA, with reference to examples. When a *Not* I recognition site is included in a target cDNA nucleotide sequence, the base sequence is altered using site-directed mutagenesis or the like, such that the encoded amino acid sequence does not change, and the *Not* I site is preferably excised in advance. The objective gene fragment is amplified from this sample by PCR, and then recovered. By adding the *Not* I site to the 5' regions of a pair of primers, both ends of the amplified fragments become *Not* I sites. E-I-S sequences are designed to be included in primers such that, after a foreign gene is inserted into the viral genome, one E-I-S sequence each is placed between the ORF of the foreign gene, and either side of the ORFs of the viral genes.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

For example, to guarantee cleavage with *Not* I, the forward side synthetic DNA sequence has a form in which any desired sequence of not less than two nucleotides (preferably four nucleotides not comprising a sequence derived from the *Not* I recognition site, such as GCG and GCC, and more preferably ACTT) is selected at the 5'-side, and a *Not* I recognition site gcggccgc is added to its 3'-side. To that 3'-side, nine arbitrary nucleotides, or nine plus a multiple of six nucleotides are further added as a spacer sequence. To the further 3' of this, a sequence corresponding to about 25 nucleotides of the ORF of a desired cDNA, including and counted from the initiation codon ATG, is added. The 3'-end of the forward side synthetic oligo DNA is preferably about 25 nucleotides, selected from the desired cDNA such that the final nucleotide becomes a G or C.

For the reverse side synthetic DNA sequence, no less than two arbitrary nucleotides (preferably four nucleotides not comprising a sequence derived from a *Not* I recognition site, such as GCG and GCC, and more preferably ACTT) are selected from the 5'-side, a *Not* I recognition site 'gcggccgc' is added to its 3'-side, and to that 3' is further added an oligo DNA insert fragment for adjusting the length. The length of this oligo DNA is designed such that the chain length of the *Not* I fragment of the final PCR-amplified product will become a multiple of six nucleotides (the so-called "rule of six"); Kolakofski, D., *et al.*, J. Virol. 72:891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993). When adding an E-I-S sequence to this primer, to the 3'-side of the oligo DNA insertion fragment is added the complementary strand sequence of the Sendai virus S, I, and E sequences, preferably 5'-CTTTCACCCT-3' (SEQ ID NO: 1), 5'-AAG-3', and 5'-TTTTTCTTACTACGG-3' (SEQ ID NO: 2), respectively; and further to this 3'-side is added a complementary strand sequence corresponding to about 25 nucleotides, counted backwards from the termination codon of a desired cDNA sequence, whose length has been selected such that the final nucleotide of the chain becomes a G or C, to make the 3'-end of the reverse side synthetic DNA.

PCR can be performed by usual methods using Taq polymerase or other DNA polymerases. Objective amplified fragments are digested with *Not* I, and then inserted into the *Not* I site of plasmid vectors such as pBluescript. The nucleotide sequences of PCR products thus obtained are confirmed with a sequencer, and plasmids comprising the correct sequence are selected. The inserted fragment is excised from these plasmids using *Not* I, and cloned into the *Not* I site of a plasmid comprising genomic cDNA. A recombinant Sendai virus cDNA can also be obtained by inserting the fragment directly into the *Not* I site of a genomic cDNA, without using a plasmid vector.

For example, a recombinant Sendai virus genomic cDNA can be constructed according to methods described in the literature (Yu, D. *et al.*, Genes Cells 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997). For example, an 18 bp spacer sequence (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3') (SEQ ID NO: 3), comprising a *Not* I restriction site, is inserted between the leader sequence and the ORF of N protein of the cloned Sendai virus genomic cDNA (pSeV(+)), obtaining plasmid pSeV18⁺b(+), which comprises an auto-cleavage
 5 ribozyme site derived from the antigenomic strand of delta hepatitis virus (Hasan, M. K. *et al.*, 1997, J. General Virology 78: 2813-2820). A recombinant Sendai virus cDNA comprising a desired foreign gene can be obtained by inserting a foreign gene fragment into the *Not* I site of pSeV18⁺b(+).

A vector of this invention can be reconstituted by transcribing a DNA encoding a
 10 genomic RNA of a recombinant paramyxovirus thus prepared, in cells in the presence of the above-described viral proteins (L, P, and N). The present invention provides DNAs encoding the viral genomic RNAs of the vectors of this invention, for manufacturing the vectors of this invention. This invention also relates to the use of DNAs encoding the genomic RNAs of the vectors, in the manufacture of the vectors of this invention. The recombinant viruses can be
 15 reconstituted by methods known in the art (WO97/16539; WO97/16538; Durbin, A. P. *et al.*, 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. *et al.*, 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. *et al.*, 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. *et al.*, 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. *et al.*, 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D.
 20 and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404). With these methods, minus strand RNA viruses including parainfluenza virus, vesicular stomatitis virus, rabies virus, measles virus, rinderpest virus, and Sendai virus can be reconstituted from DNA. The vectors of this invention can be reconstituted according to these methods. When a viral vector DNA is made F gene, HN gene, and/or M gene
 25 deficient, such DNAs do not form infectious virions as is. However, infectious virions can be formed by separately introducing host cells with these deficient genes, and/or genes encoding the envelope proteins of other viruses, and then expressing these genes therein.

Specifically, the viruses can be prepared by the steps of: (a) transcribing cDNAs encoding paramyxovirus genomic RNAs (negative strand RNAs), or complementary strands
 30 thereof (positive strands), in cells expressing N, P, and L proteins; and (b) harvesting culture supernatants thereof comprising the produced paramyxovirus. For transcription, a DNA encoding a genomic RNA is linked downstream of an appropriate promoter. The genomic RNA thus transcribed is replicated in the presence of N, L, and P proteins to form an RNP complex. Then, in the presence of M, HN, and F proteins, virions enclosed in an envelope are formed. For
 35 example, a DNA encoding a genomic RNA can be linked downstream of a T7 promoter, and transcribed to RNA by T7 RNA polymerase. Any desired promoter can be used as a promoter,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

in addition to those comprising a T7 polymerase recognition sequence. Alternatively, RNA transcribed *in vitro* may be transfected into cells.

Enzymes essential for the initial transcription of genomic RNA from DNA, such as T7 RNA polymerase, can be supplied by transducing the plasmid or viral vectors that express them, or, for example, by incorporating the RNA polymerase gene into a chromosome of the cell so as to enable induction of its expression, and then inducing expression at the time of viral reconstitution. Further, genomic RNA and viral proteins essential for vector reconstitution are supplied, for example, by transducing the plasmids that express them. In supplying these viral proteins, helper viruses such as the wild type or certain types of mutant paramyxovirus are used.

Methods for transducing DNAs expressing the genomic RNAs into cells include, for example, (i) methods for making DNA precipitates which target cells can internalize; (ii) methods for making complexes comprising DNAs that are suitable for internalization by target cells, and have a low-cytotoxic positive charge; and (iii) methods for using electric pulses to instantaneously create holes in the target cell membrane, which are of sufficient size for DNA molecules to pass through.

For (ii), various transfection reagents can be used. For example, DOTMA (Roche), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Roche #1811169), and such can be cited. As (i), for example, transfection methods using calcium phosphate can be cited, and although DNAs transferred into cells by this method are internalized by phagosomes, a sufficient amount of DNA is known to enter the nucleus (Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223). Chen and Okayama investigated the optimization of transfer techniques, reporting that (1) incubation conditions for cells and coprecipitates are 2 to 4% CO₂, 35°C, and 15 to 24 hours, (2) the activity of circular DNA is higher than linear DNA, and (3) optimal precipitation is obtained when the DNA concentration in the precipitate mixture is 20 to 30 µg/ml (Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745). The methods of (ii) are suitable for transient transfections. Methods for performing transfection by preparing a DEAE-dextran (Sigma #D-9885 M.W. 5x 10⁵) mixture with a desired DNA concentration ratio have been known for a while. Since most complexes are decomposed in endosomes, chloroquine may also be added to enhance the effect (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015). The methods of (iii) are referred to as electroporation methods, and are used more in general than methods (i) or (ii) because they are not cell-selective. The efficiency of these methods is supposed to be good under optimal conditions for: the duration of pulse electric current, shape of the pulse, potency of electric field (gap between electrodes, voltage), conductivity of buffer, DNA concentration, and cell density.

Of the above three categories, the methods of (ii) are simple to operate and facilitates examination of many samples using a large amount of cells, making transfection reagents

THIS PAGE BLANK (USPTO)

suitable for the transduction into cells of DNA for vector reconstitution. Preferably, the Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305), or the DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Roche, Cat No. 1811169) is used, but transfection reagents are not limited to these.

Specifically, virus reconstitution from cDNA can be carried out, for example, as follows:

In a plastic plate of about 6 to 24 wells, or a 100-mm Petri dish or the like, simian kidney-derived LLC-MK2 cells are cultured up to about 100% confluency, using minimum essential medium (MEM) comprising 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (100 units/ml penicillin G and 100 µg/ml streptomycin). Then they are infected with, for example, two plaque forming units (PFU)/cell of the recombinant vaccinia virus vTF7-3, which expresses T7 RNA polymerase and has been inactivated by 20-minutes of UV irradiation in the presence of 1 µg/ml psoralen (Fuerst, T. R. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986; Kato, A. *et al.*, Genes Cells 1: 569-579, 1996). The amount of psoralen added and the UV irradiation time can be appropriately adjusted. One hour after infection, 2 to 60 µg, and more preferably 3 to 20 µg, of DNA encoding the genomic RNA of a recombinant Sendai virus is transfected along with the plasmids expressing trans-acting viral proteins essential for viral RNP production (0.5 to 24 µg of pGEM-N, 0.25 to 12 µg of pGEM-P, and 0.5 to 24 µg of pGEM-L) (Kato, A. *et al.*, Genes Cells 1: 569-579, 1996), using the lipofection method or such with Superfect (QIAGEN). For example, the ratio of the amounts of expression vectors encoding the N, P, and L proteins is preferably 2:1:2, and the plasmid amounts are appropriately adjusted in the range of 1 to 4 µg of pGEM-N, 0.5 to 2 µg of pGEM-P, and 1 to 4 µg of pGEM-L.

The transfected cells are cultured, as desired, in serum-free MEM comprising 100 µg/ml of rifampicin (Sigma) and cytosine arabinoside (AraC), more preferably only 40 µg/ml of cytosine arabinoside (AraC) (Sigma). Optimal drug concentrations are set so as to minimize cytotoxicity due to the vaccinia virus, and to maximize virus recovery rate (Kato, A. *et al.*, 1996, Genes Cells 1: 569-579). After culturing for about 48 to 72 hours after transfection, cells are harvested, and then disintegrated by repeating freeze-thawing three times. LLC-MK2 cells are re-infected with the disintegrated materials comprising RNP, and cultured. Alternatively, the culture supernatant is recovered, added to a culture solution of LLC-MK2 cells to infect them, and the cells are then cultured. Transfection can be conducted by, for example, forming a complex with lipofectamine, polycationic liposome, or the like, and transducing the complex into cells. Specifically, various transfection reagents can be used. For example, DOTMA (Roche), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, and DOSPER (Roche #1811169) may be cited. In order to prevent decomposition in the endosome, chloroquine may also be added (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015). In cells transduced with RNP, viral gene expression from RNP and RNP replication progress, and the vector is amplified. By

THIS PAGE BLANK (USPTO)

diluting the viral solution thus obtained (for example, 10^6 -fold), and then repeating the amplification, the vaccinia virus vTF7-3 can be completely eliminated. Amplification is repeated, for example, three or more times. Vectors thus obtained can be stored at -80°C . In order to reconstitute a viral vector having no replication ability and lacking a gene encoding an envelope protein, LLC-MK2 cells expressing the envelope protein may be used for transfection, or a plasmid expressing the envelope protein may be cotransfected. Alternatively, a defective type viral vector can be amplified by culturing the transfected cells overlaid with LLC-MK2 cells expressing the envelope protein (see WO00/70055 and WO00/70070).

Titers of viruses thus recovered can be determined, for example, by measuring CIU (Cell-Infected Unit) or hemagglutination activity (HA) (WO00/70070; Kato, A. *et al.*, 1996, *Genes Cells* 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. *Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine*: Humana Press: pp. 295-306, 1999). Titers of vectors carrying GFP (green fluorescent protein) marker genes and the like can be quantified by directly counting infected cells, using the marker as an indicator (for example, as GFP-CIU). Titers thus measured can be treated in the same way as CIU (WO00/70070).

As long as a viral vector can be reconstituted, the host cells used in the reconstitution are not particularly limited. For example, in the reconstitution of Sendai virus vectors and such, cultured cells such as LLC-MK2 cells and CV-1 cells derived from monkey kidney, BHK cells derived from hamster kidney, and cells derived from humans can be used. By expressing suitable envelope proteins in these cells, infectious virions comprising the envelope can also be obtained. Further, to obtain a large quantity of a Sendai virus vector, a viral vector obtained from an above-described host can be infected to embrionated hen eggs, to amplify the vector. Methods for manufacturing viral vectors using hen eggs have already been developed (Nakanishi, *et al.*, ed. (1993), "State-of-the-Art Technology Protocol in Neuroscience Research III, Molecular Neuron Physiology", Koseisha, Osaka, pp. 153-172). Specifically, for example, a fertilized egg is placed in an incubator, and cultured for nine to twelve days at 37 to 38°C to grow an embryo. After the viral vector is inoculated into the allantoic cavity, the egg is cultured for several days (for example, three days) to proliferate the viral vector. Conditions such as the period of culture may vary depending upon the recombinant Sendai virus being used. Then, allantoic fluids comprising the vector are recovered. Separation and purification of a Sendai virus vector from allantoic fluids can be performed according to a usual method (Tashiro, M., "Virus Experiment Protocol," Nagai, Ishihama, ed., Medical View Co., Ltd., pp. 68-73, (1995)).

For example, the construction and preparation of Sendai virus vectors defective in F gene can be performed as described below (see WO00/70055 and WO00/70070).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<1> Construction of a genomic cDNA of an F-gene defective Sendai virus, and a plasmid expressing F gene

A full-length genomic cDNA of Sendai virus (SeV), the cDNA of pSeV18⁺ b (+) (Hasan, M. K. *et al.*, 1997, J. General Virology 78: 2813-2820) ("pSeV18⁺ b (+)" is also referred to as "pSeV18⁺"), is digested with SphI/KpnI to recover a fragment (14673 bp), which is cloned into pUC18 to prepare plasmid pUC18/KS. Construction of an F gene-defective site is performed on this pUC18/KS. An F gene deficiency is created by a combination of PCR-ligation methods, and, as a result, the F gene ORF (ATG-TGA = 1698 bp) is removed. Then, for example, atgcatgccggcagatga (SEQ ID NO: 4) is ligated to construct an F gene-defective type SeV genomic cDNA (pSeV18⁺/ΔF). A PCR product formed in PCR by using the pair of primers [forward: 5'-gttgagtactgcaagagc/SEQ ID NO: 5, reverse: 5'-tttgccggcatgcatgtttccaaggggagagttttgcaacc/SEQ ID NO: 6] is connected upstream of F, and a PCR product formed using the pair of primers [forward: 5'-atgcatgccggcagatga/SEQ ID NO: 7, reverse: 5'-tgggtgaatgagagaatcagc/SEQ ID NO: 8] is connected downstream of F gene at EcoT22I. The plasmid thus obtained is digested with SacI and SalI to recover a 4931 bp fragment of the region comprising the F gene-defective site, which is cloned into pUC18 to form pUC18/dFSS. This pUC18/dFSS is digested with DraIII, the fragment is recovered, replaced with the DraIII fragment of the region comprising the F gene of pSeV18⁺, and ligated to obtain the plasmid pSeV18⁺/ΔF.

A foreign gene is inserted, for example, into the *Nsi* I and *Ngo* MIV restriction enzyme sites in the F gene-defective site of pUC18/dFSS. For this, a foreign gene fragment may be, for example, amplified using an *Nsi* I-tailed primer and an *Ngo* MIV-tailed primer.

<2> Preparation of helper cells that induce SeV-F protein expression

To construct an expression plasmid of the Cre/loxP induction type that expresses the Sendai virus F gene (SeV-F), the SeV-F gene is amplified by PCR, and inserted to the unique *Swa* I site of the plasmid pCALNdlw (Arai, T. *et al.*, J. Virology 72, 1998, p1115-1121), which is designed to enable the inducible expression of a gene product by Cre DNA recombinase, thus constructing the plasmid pCALNdLw/F.

To recover infectious virions from the F gene-defective genome, a helper cell line expressing SeV-F protein is established. The monkey kidney-derived LLC-MK2 cell line, which is commonly used for SeV proliferation, can be used as the cells, for example. LLC-MK2 cells are cultured in MEM supplemented with 10% heat-treated inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin G sodium (50 units/ml), and streptomycin (50 µg/ml) at 37°C in 5% CO₂. Since the SeV-F gene product is cytotoxic, the above-described plasmid pCALNdLw/F, which was designed to enable inducible expression of the F gene product with Cre DNA recombinase, is

THIS PAGE BLANK (USPTO)

transfected to LLC-MK2 cells for gene transduction by the calcium phosphate method (using a mammalian transfection kit (Stratagene)), according to protocols well known in the art.

The plasmid pCALNdLw/F (10 μ g) is transduced into LLC-MK2 cells grown to 40% confluency using a 10-cm plate, and the cells are then cultured in MEM (10 ml) comprising 10% FBS, in a 5% CO₂ incubator at 37°C for 24 hours. After 24 hours, the cells are detached and suspended in the medium (10 ml). The suspension is then seeded into five 10-cm dishes, 5 ml into one dish, 2 ml each into two dishes, and 0.2 ml each into two dishes, and cultured in MEM (10 ml) comprising G418 (GIBCO-BRL) (1200 μ g/ml) and 10% FBS. The cells were cultured for 14 days, exchanging the medium every two days, to select cell lines stably transduced with the gene. The cells grown from the above medium that show G418 resistance are recovered using a cloning ring. Culture of each clone thus recovered is continued in 10-cm plates until confluent.

After the cells have grown to confluency in a 6-cm dish, F protein expression is induced by infecting the cells with Adenovirus AxCANCre, for example, at MOI = 3, according to the method of Saito, *et al.* (Saito *et al.*, Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. *et al.*, J. Virol 72, 1115-1121 (1998)).

<3> Reconstitution and amplification of F-gene defective Sendai virus (SeV)

The above-described plasmid pSeV18⁺/ΔF, into which a foreign gene has been inserted, is transfected to LLC-MK2 cells as follows: LLC-MK2 cells are seeded at 5x 10⁶ cells/dish into 100-mm dishes. When genomic RNA transcription is carried out with T7-RNA polymerase, cells are cultured for 24 hours, then infected at an MOI of about two for one hour at room temperature, with recombinant vaccinia virus expressing T7-RNA polymerase, which has been treated with psoralen and long-wave ultraviolet rays (365 nm) for 20 minutes (PLWUV-VacT7: Fuerst, T. R. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)). For the ultraviolet ray irradiation of vaccinia virus, for example, an UV Stratalinker 2400 equipped with five 15-watt bulbs can be used (catalogue No. 400676 (100V), Stratagene, La Jolla, CA, USA). The cells are washed with serum-free MEM, then an appropriate lipofection reagent is used to transfect the cells with a plasmid expressing the genomic RNA, and expression plasmids expressing the N, P, L, F, and HN proteins of *Paramyxovirus* respectively. The ratio of the amounts of these plasmids can be preferably set as 6:2:1:2:2:2, in this order, though not limited thereto. For example, a genomic RNA-expressing plasmid as well as expression plasmids expressing the N, P, L, and F plus HN proteins (pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, and pGEM/F-HN; WO00/70070, Kato, A. *et al.*, Genes Cells 1, 569-579 (1996)) are transfected at an amount ratio of 12 μ g:12 μ g: 4 μ g: 2 μ g: 4 μ g:4 μ g per dish, respectively. After culturing for several hours, the cells are washed twice with serum-free MEM, and cultured in MEM comprising 40 μ g/ml of cytosine β -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

D-arabinofuranoside (AraC: Sigma, St. Louis, MO) and 7.5 $\mu\text{g/ml}$ of trypsin (Gibco-BRL, Rockville, MD). These cells are recovered, and the pellets are suspended in Opti-MEM (10^7 cells/ml). Suspensions are freeze-thawed three times, mixed with lipofection reagent DOSPER (Boehringer Mannheim) (10^6 cells/25 μl DOSPER), stood at room temperature for 15 minutes, transfected to the above-described cloned F-expressing helper cells (10^6 cells/well in a 12-well-plate), and cultured in serum-free MEM (comprising 40 $\mu\text{g/ml}$ AraC and 7.5 $\mu\text{g/ml}$ trypsin) to recover the supernatant. Viruses lacking a gene other than F, for example, the HN or M gene, can also be prepared by methods similar to this.

For example, when preparing a gene-deficient viral vector, two or more types of vectors containing viral genomes lacking different viral genes can be introduced into the same cell, and the viral proteins absent from one vector can be supplied through the expression of the other vectors. These vectors complement each other and form infectious virions, thereby turning on the replication cycle for amplification of viral vectors. That is, two or more types of vectors of this invention can be injected into a cell in combinations of complementary viral proteins, to produce, on a large scale and at a low cost, mixtures of viral vectors lacking the respective viral genes. Compared to viruses that do not lack viral genes, these viruses have a reduced genome size because they are deficient in viral genes, and are thus able to carry large-sized foreign genes. These viral gene-deficient viruses do not have proliferation ability and are diluted extracellularly. This makes maintenance of coinfection difficult, resulting in sterility, which is advantageous from the viewpoint of managing environmental release of these viruses.

Foreign genes to be transduced by the paramyxoviruses of this invention are not particularly limited, and examples of naturally occurring proteins are hormones, cytokines, growth factors, receptors, intracellular signal transduction molecules, enzymes, peptides, etc. Proteins may be secretory proteins, membrane proteins, cytoplasmic proteins, nuclear proteins, etc. Examples of artificial proteins are fusion proteins such as chimeric toxins, dominant negative proteins (including soluble receptor molecules and membrane-bound type receptors), deletant cell adhesion molecules, cell surface molecules, and such. Artificial proteins may be proteins with added secretory signals, membrane localization signals, nuclear localization signals, etc. By expressing a transgene such as an anti-sense RNA molecule, RNA-cleaving ribozyme or such, the function of a specific gene expressed in T cells can be suppressed. Gene therapy can be performed by administering, as a foreign gene, a viral vector prepared using a therapeutic gene for a disease. The viral vectors of this invention can be applied in gene therapy through direct or indirect (*ex vivo*) administration of the vectors by gene expression methods that express, for example, foreign genes with promising therapeutic effects or endogenous genes whose supply is insufficient within the patient's body. Further, the methods of this invention can also be applied to gene therapy vectors in regenerative medicine.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

When, after administering a replicative paramyxovirus vector to an individual or cell, the proliferation of the viral vector must be restrained due to completion of treatment and such, it is also possible to specifically restrain only the proliferation of the viral vector, with no damage to the host, by administering an RNA-dependent RNA polymerase inhibitor.

According to the methods for producing a virus described herein, the viral vectors of this invention can be released into the culture medium of virus-producing cells, for example, at a titer of 1×10^5 CIU/ml or more, preferably 1×10^6 CIU/ml or more, more preferably 5×10^6 CIU/ml or more, more preferably 1×10^7 CIU/ml or more, more preferably 5×10^7 CIU/ml or more, more preferably 1×10^8 CIU/ml or more, and more preferably 5×10^8 CIU/ml or more.

Viral titers can be measured by a method described in this description or other methods (Kiyotani, K. *et al.*, Virology 177(1), 65-74 (1990); WO00/70070).

The recovered paramyxovirus vectors can be purified to become substantially pure. Purification can be performed by purification and separation methods known in the art, including filtration, centrifugal separation, and column purification, or any combinations thereof.

“Substantially pure” means that a viral vector accounts for a major proportion of a sample in which the viral vector exists as a component. Typically, a substantially pure viral vector can be identified by confirming that the proportion of proteins derived from the viral vector is 10% or more of all of the proteins in a sample, preferably 20% or more, more preferably 50% or more, preferably 70% or more, more preferably 80% or more, and further more preferably 90% or more (excluding, however, proteins added as carriers or stabilizers). Examples of specific methods for purifying paramyxoviruses are those that use cellulose sulfate ester or cross-linked polysaccharide sulfate ester (Examined Published Japanese Patent Application No. (JP-B) Sho 62-30752, JP-B Sho 62-33879, and JP-B Sho 62-30753), and those that involve adsorption onto polysaccharides comprising fucose sulfate and/or degradation products thereof (WO97/32010).

In preparing compositions comprising a vector, the vector can be combined with a pharmaceutically acceptable carrier or vehicle of choice, as necessary. “A pharmaceutically acceptable carrier or vehicle” means a material that can be administered together with the vector which does not significantly inhibit gene transduction via the vector. For example, a vector can be appropriately diluted with physiological saline, phosphate-buffered saline (PBS), or culture medium to form a composition. When a vector is grown in hen eggs or the like, the “pharmaceutically acceptable carrier or vehicle” may comprise allantoic fluids. Further, compositions comprising a vector may include carriers or vehicles such as deionized water and 5% dextrose aqueous solution. Furthermore, compositions may comprise, besides the above, plant oils, suspending agents, surfactants, stabilizers, biocides, and so on. The compositions can also comprise preservatives or other additives. The compositions comprising the vectors of this invention are useful as reagents and medicines.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gene transduction into T cells using the vectors of this invention is expected to be applied to gene therapy for various disorders. Such gene therapy can be performed to, for example, correct aberrant cellular expression of a gene due to the deficiency thereof, impart a novel function to a cell via introduction of a foreign gene, or suppress an undesirable function in a cell by introducing a gene with suppressive action towards a particular gene.

The methods of this invention are useful in, for example, suppressing rejection responses in autoimmune diseases and others. For example, rejection responses can be expected to be controlled by suppressing alloreaactions of T cells *in vivo* or inducing suppressive dendritic cells. This involves using an established activated T cell line that recognizes an alloantigen or a major antigen that is causing the autoimmune disease, and actively expressing suppressive cytokines such as IL-10 in the established T cell line according to the methods of this invention. Further, cancer therapy that utilizes T cell gene transduction using the methods of this invention is also expected. For example, when a vector carrying a vascular proliferation-suppressing gene is transduced into T cells that recognize a tumor-specific antigen, suppressive effects of local tumor growth are expected. Alternatively, in the case of demyelinating diseases such as Multiple Sclerosis, disease progression can be expected to be controlled by using T cells activated with a target antigen to transduce a gene, such as the PDGF gene (platelet derived growth factor-A) which is capable of differentiating oligodendrocytes from stem cells, thereby inducing the local regeneration of oligodendrocytes (Vincent, K.T. *et al.*, Journal of Neuroimmunology, 2000, 107: 226-232). In addition, it is possible to apply the methods of this invention to all diseases and injuries, where the therapeutic effects through gene transduction using antigen-activated T cells or antigen-nonspecific activated T cells (T cells activated using an antibody or mitogen) are expected.

Host-derived factors such as interferons (IFNs) affect the transcription of paramyxovirus-transduced genes (Kato, A. *et al.*, J. Virol., 2001, 75: 3802-3810). Since large amounts of IFNs are produced from T cell lines stimulated with alloantigens, IFNs such as IFN- γ are likely to affect the transcription of genes harbored on paramyxovirus vectors (Biron, C.A. and Sen, G.C., Interferons and other cytokine. *In*: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields of virology. Vol. 2. Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, 1996. 321-351). In fact, the present inventors discovered that the alloactivated T cell lines from IFN- γ receptor-deficient mice maintain relatively high levels of EGFP expression for more than 3 weeks. Therefore, in T cell-directed gene therapy that requires high-level expression of a target gene, suppression of IFN- γ signal transduction is likely to be effective.

Vector dose may vary depending upon the disorder, body weight, age, gender, and symptoms of the patient, as well as the purpose of administration, form of the composition to be administered, administration method, gene to be transduced, and so on; however, those skilled in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

the art can appropriately determine dosages. Administration route can be appropriately selected. Administration can also be performed locally or systemically. Doses of the vector are preferably administered in a pharmaceutically acceptable carrier in a range of preferably about 10^5 CIU/ml to about 10^{11} CIU/ml, more preferably about 10^7 CIU/ml to about 10^9 CIU/ml, most preferably about 1×10^8 CIU/ml to about 5×10^8 CIU/ml. In humans, a single dose is preferably in the range of 2×10^5 CIU to 2×10^{11} CIU, and can be administered once or more, so long as the side effects are within a clinically acceptable range. The same applies to the number of administrations per day. With animals other than humans, for example, the above-described doses can be converted based on the body weight ratio or volume ratio of a target site for administration (e.g. average values) between the objective animal and humans, and the converted doses can be administered to the animals. In the case of an *ex vivo* administration, the vector is brought into contact with T cells *in vitro* (for example, in a test tube or Petri dish). Vectors are administered to T cells at an MOI in the range of preferably 1 to 500, more preferably 2 to 300, and further more preferably 3 to 200. Subjects to whom compositions comprising the vectors of this invention are administered include all mammals, such as humans, monkeys, mice, rats, rabbits, sheep, cattle, and dogs.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a series of dot plot graphs representing the gene transduction efficiency of SeV into murine T cells (activated or naive T cells). Murine lymphocytes were cultured in the presence or absence of SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU) (MOI=62.5) for two days, and cells were recovered and stained with APC-conjugated anti-CD3 and PE-conjugated anti-CD4 (upper panel) or CD8 antibodies (lower panel). Dot plots represent the expression of CD4 or CD8 and GFP among viable $CD3^+ CD4^+$ - or $CD3^+ CD8^+$ -lymphocytes. In the right upper corners of the respective quadrants, gene transduction efficiency was shown as the percentage of EGFP-positive cells. Left panel: cells were cultured in non-Ab-coated wells. Central panel: cells were cultured in wells coated with activating antibodies (anti-CD3- and anti-CD28-antibodies). Right panel: cells were cultured in wells coated with activating antibodies (anti-CD3- and anti-CD28-antibodies) in the absence of SeV-EGFP. Similar data were obtained from cells cultured with luciferase-expressing SeV-luci (negative control). Reproducible data were obtained from more than four independent experiments.

Fig. 2 is a series of dot plots representing the efficiency of SeV-mediated gene transduction into T cell lines. T cell lines were cultured in the presence or absence of SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU) (MOI=62.5) for two days, and the recovered cells were stained with APC-conjugated anti-CD3 and PE-conjugated anti-CD4 (upper panel) or anti-CD8 antibodies (lower panel). Dot plots in the leftmost panel represent the expression of CD3 and CD4 or CD8 among

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gated (sorted) viable lymphocytes, showing the percentages of lymphocytes in the respective four quadrants. Dot plots in the other panels represent EGFP expression in CD4-T or CD8-T cells among gated CD3-positive viable lymphocytes. In the second panel from the left, cells were cultured with irradiated B6 stimulators (stimulator cells). In the third panel, cells were cultured with irradiated Balb/c stimulators (stimulator cells). In the last panel, cells were cultured with irradiated Balb/c stimulators (stimulator cells) without SeV-EGFP. Reproducible data were obtained from more than four independent experiments.

Fig. 3 is a series of dot plots representing the gene transduction efficiency under alloantigen-specific activation of naive T cells and T cell lines. Naive 2C lymphocytes (upper panel: with the letter "1x") or 2C T cell lines (lower panel: with the letter "3x") were cultured in the presence or absence of SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU) for two days. Cells were recovered and stained with APC-conjugated anti-CD8 and biotinylated anti-clonotypic T cell receptor mAb (1B2), followed by PE streptavidin. The leftmost panel represents the percentage of CD8⁺ 1B2⁺ T cells among gated viable lymphocytes. Dot plots in the other panels represent the EGFP expression of viable clonotypic T cells. In the second panel from the left, cells were cultured with irradiated B6 stimulators (stimulator cells). In the third panel, cells were cultured with irradiated Balb/c stimulators (stimulator cells). In the last panel, cells were cultured with irradiated Balb/c stimulators (stimulator cells) without SeV-EGFP. Reproducible data were obtained from two independent experiments.

Fig. 4 is a bar graph representing the effect of bystander activation on SeV-mediated gene transduction. In the presence (indicated by plus sign below the X axis) or absence (indicated by minus sign below the X axis) of SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU), 50 μ l of 2C naive lymphocytes (1×10^7 /ml) and 50 μ l of B6 naive lymphocytes (1×10^7 /ml) were stimulated with 100 μ l each of irradiated Balb/c (solid bar), B6 (light shaded bar), or C3H (dark shaded bar) lymphocytes (1×10^7 /ml), or without lymphocytes (open bar) for two days. The percentage of EGFP-positive cells among gated viable CD8⁺ 1B2⁺ T cells was obtained. Y axis represents the percentage of EGFP-positive clonotypic cells. Each data was shown as the mean percentage \pm SEM (Standard Error of the Means) of triplicate wells (n=3), and similar results were observed in two independent experiments. There was a statistically significant difference ($p < 0.01$) between 2C T cells stimulated with C3H and those stimulated with Balb/c, but not between 2C T cells stimulated with C3H and those stimulated with B6. Statistical significance was determined using the one-way analysis of variance and Fisher's PLSD test.

Fig. 5 is a series of dot plots representing the maintenance of GFP expression in T cells transduced with SeV-EGFP. In the presence of SeV-EGFP, T cell lines from 2C-tg mice were stimulated with irradiated B6 (left column) or Balb/c (right column) lymphocytes for six days. The transduced T cells were washed with fresh media, and then re-stimulated with irradiated B6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

or Balb/c stimulator in the absence of SeV for six or seven days. Dot plots show the EGFP expression of viable clonotypic T cells. The number in the upper-right corner of the respective quadrants represents the percentage of EGFP-positive or negative clonotypic T cells at day 13 (top panel) or day 20 (middle panel). Data from the uninfected 2C T cell line (negative control) stimulated for 20 days were shown (bottom panel). These data are representative of two separate experiments.

Fig. 6 is a series of dot plots representing the efficiency of SeV-mediated gene transduction into human T cells (activated or naive T cells). 200 μ l of human lymphocytes (4×10^6 /ml) were cultured in the presence or absence of SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU) (MOI=31) for two days. Cells were recovered and stained with APC-conjugated anti-CD3 and PE-conjugated anti-CD4 (top panel) or CD8 antibodies (bottom panel). Dot plots represent the expression of CD4 or CD8 and GFP among viable $CD3^+ CD4^+$ or $CD3^+ CD8^+$ T lymphocytes, respectively. Gene transduction efficiency was expressed as the relative ratio of EGFP-positive cells among T cells shown in the plot. Left panel: cells were cultured in non-Ab-coated wells. Middle panel: cells were cultured in wells coated with activating antibodies (anti-CD3 and anti-CD28 antibodies). Right panel: cells were cultured in wells coated with activating antibodies (anti-CD3- and anti-CD28-antibodies) without SeV-EGFP. Similar data were obtained from cells cultured with SeV-luci (negative control). The numbers in the right-hand corners of the respective quadrants represent the percentages of the individual populations. Reproducible data were obtained from more than four independent experiments.

Fig. 7 is a series of dot plots representing the gene transduction efficiency into human naive or memory/activated T cells. The newly isolated T cells were cultured with SeV-EGFP in non-Ab-coated wells for two days. Cells were recovered and stained with APC-conjugated anti-CD62L, PE-conjugated anti-CD3, and biotinylated anti-CD45RA antibodies, and then with streptavidin-PerCP. In the left panel, dot plots represent the expression of CD62L and CD45RA in gated (sorted) viable CD3-positive T cells. The right panel dot plots represent the expression of CD3 and EGFP in $CD62L^{high}$ and $CD45RA^{high}$ T cells, which are either naive T cells (top panel) or memory/activated T cells (bottom panel). Reproducible data were obtained from three experiments using samples from healthy donors.

Fig. 8 is a series of dot plots representing the gene transduction efficiency into human T cell lines. The human T cell lines were cultured, as described in Fig. 6, in the presence or absence of SeV-EGFP for two days, and analyzed as described in Fig. 6. Percentages of EGFP expression in CD4 (top panel) and CD8 (bottom panel) T cells were shown. Left panel: cells were cultured in non-Ab-coated wells. Central panel: cells were cultured in wells coated with antibodies (human anti-CD3 and anti-CD28 antibodies). Right panel: cells were cultured in wells coated with antibodies (human anti-CD3- and anti-CD28-antibodies) in the absence of

THIS PAGE BLANK (uspto)

SeV-EGFP.

Fig. 9 represents bar graphs showing the assessment of SeV entry into naive or activated T cells. After B6 lymphocytes (4×10^6 /ml) were incubated in the presence (open or shaded bar) or absence (solid bar) of UV-inactivated SeV-luci for 30 min at 37°C, the cells were thoroughly washed and incubated with SeV-EGFP (MOI=62.5) for 30 min at 37°C. After the cells were washed three times, 200 µl of the cell suspension (2×10^6 /ml) was cultured in activated wells coated with mouse anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the absence of the virus for two days. As a positive control, the prepared cells were cultured with SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU) in activated wells for two days (open bar). Cells were recovered and stained with APC-conjugated anti-CD3 and PE-conjugated anti-CD8 antibodies. The percentage of EGFP-positive cells among gated (sorted) viable CD3⁺ CD4⁺ or CD3⁺ CD8⁺ T cells was obtained. The Y-axis shows the percentage of EGFP-positive CD4 (three bars on the left) or CD8 (three bars on the right) T cells. Respective data were expressed as the mean percentage \pm SEM of triplicate wells (n=3). There were statistically significant differences among the individual populations ($p < 0.01$). Statistical significance was determined by the one-way analysis of variance and Fisher's PLSD test.

Fig. 10 represents a graph showing the assessment of SeV entry into naive or activated T cells. After 30 minutes of incubation at 4°C in the absence (the leftmost scale along the X axis) or presence (other scales on the X axis) of SeV-EGFP (MOI=100) for 30 min at B6 lymphocytes were washed thoroughly and incubated without SeV for 0, 15, 30, 45, or 90 min at 37°C. After three washes, the cells incubated for the indicated periods were cultured in activated wells coated with mouse anti-CD3 and anti-CD28-antibodies for two days. The cells were recovered and stained as described in Fig. 9 (CD4 T cells were represented by solid circles and CD8 T cells by solid squares). As a positive control, the prepared cells were cultured with SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU) (MOI=62.5) (CD4 T cells were represented by open circles and CD8 T cells by open squares). Values were expressed as the mean percentage \pm SEM of triplicate wells (n=3). In both CD4 and CD8 T cells, there was a statistically significant difference ($p < 0.01$) between incubation at 37°C for 0 min and incubation for 15 min. Further, there was also a statistically significant difference ($p < 0.01$) between incubation at 37°C for 0 min and incubation for 90 min. Statistical significance was determined by the one-way analysis of variance and Fisher's PLSD test.

Best Mode for Carrying Out the Invention

Hereinafter, the present invention will be explained in more detail with reference to examples, but it is not to be construed as being limited thereto. All references cited in this description are incorporated into the description as parts thereof. Statistical significance was

THIS PAGE BLANK (USPTO)

determined by the one-way analysis of variance and Fisher's PLSD test with a statistical significance of $P < 0.05$.

Animals

Inbred female C57BL/6 (H-2^b) (abbreviated B6) mice, C3H (H-2^k) mice, and Balb/c (H-2^d) mice of Charles River grade mice were purchased from KBT Oriental (Tosu, Japan). 2C transgenic mice (2c-tg, H-2^b) which are transgenic mice of the Class I MHC antigen L^d-reactive T cell receptor (TCR) are described in the reference Sha, W.C. *et al.*, *Nature*, 1988, 335: 271-274. Mice were all treated humanely, maintained in specific-pathogen-free facilities, and fed with standard rodent diet and tap water. Mice at 7 to 9 weeks of age were used. Animal experiments were inspected by the Ethics Committee for Animal Experiments and Recombinant DNA Experiments, Kyushu University, and were performed in accordance with the "Guidelines for Animal Experiments" of the National Institute of Health, U.S.A. "Principles of Laboratory Animal Care" and "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" were also followed.

Construction of recombinant SeVs

SeVs carrying the EGFP (jellyfish enhanced green fluorescent protein) gene (SeV-EGFP) or the firefly luciferase gene (SeV-luci) were constructed as described in Kato *et al.* (Kato, A. *et al.*, *Genes Cells*, 1996, 1: 569-579; Sakai, Y. *et al.*, *FEBS Lett.*, 1999, 456: 221-226). Specifically, an 18 bp spacer sequence 5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3' (SEQ ID NO: 3) with a *Not* I restriction enzyme site was inserted between the 5'-nontranslated region and the initiation codon of the nucleocapside (N) gene on a vector that harbors a cDNA encoding the SeV genome. This cloned SeV genomic cDNA-comprising vector also contains a self-cleaving ribozyme site derived from the antigenomic strand of the delta hepatitis virus. The entire cDNA encoding EGFP (of SeV-EGFP) or luciferase (of SeV-luci) was amplified by PCR, using primers containing a *Not* I site and sets of E and S signal sequence tags from the new SeV for foreign gene expression, and inserted into the *Not* I site of the above-described cloned genome. The full length of the template SeV genome, including the foreign gene, was arranged to contain multiples of six nucleotides according to the so-called "rule of six" (Kolakofsky, D. *et al.*, *J. Virol.*, 1998, 72: 891-899). The template SeV genome carrying an foreign gene, and plasmids encoding N, phospho(P), and large(L) proteins (pGEM-N, pGEM-P, and pGEM-L, respectively) was complexed with commercially available cationic lipids, and co-transfected with vaccinia virus vT7-3 into CV-1 or LLCMK cells (Fuerst, T.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1986, 83: 8122-8126). Forty hours later, the cells were disrupted in three cycles of freezing and thawing, and injected into the chorioallantoic cavity of ten-day-old embrionated chicken eggs. The virus was then recovered and the vaccinia virus was eliminated by a second propagation in chicken

THIS PAGE BLANK (USPTO)

eggs. Virus titer was determined by hemagglutination assay using chicken erythrocytes (Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999), and the virus was stored at -80°C until use.

Monoclonal antibodies (mAb)

The biotinylated human CD45 RA (HI100) mAb, allophycocyanin (APC)-conjugated anti-mouse CD3 (145-2C11), APC-conjugated anti-mouse CD8 (53-6.7), and APC-conjugated anti-human CD62L (DREG-56) mAbs, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD3 (UCHT1), PE-conjugated anti-human CD4 (RPA-T4), PE-conjugated anti-mouse CD4 (GK1.5), and PE-conjugated anti-mouse CD8 (53.67) mAbs, PE-conjugated streptavidin, as well as peridininchlorophyll α protein (perCP)-conjugated streptavidin were purchased from PharMingen (San Diego, CA, USA).

APC-conjugated anti-human CD3 (UCHT1) mAb was purchased from DAKO (Kyoto, Japan). PE-conjugated anti-human CD8 (NU-Ts/c) mAb was purchased from Nichirei (Tokyo, Japan). Anti-2C clonotypic TCR determinant mAb was purified by the present inventors from hybridoma culture supernatants (1B2) (Sha, W.C. *et al.*, Nature, 1988, 335: 271-274) using a HiTrap protein G column (Amersham Pharmacia Bioscience Inc., Buckinghamshire UK), and biotinylated using an EZ-LinkTM NHS-LC Biotin (PIERCE Biotechnology Inc., Rockford, IL, U.S.A.).

For T cell activation, purified anti-mouse-CD3 (145-2C11), mouse-CD28 (37.51), anti-human-CD3 (HIT3a), and -CD28 (CD28.2) mAbs purchased from PharMingen (San Diego, CA, USA) were used.

Preparation of cells

RPMI 1640 medium (SIGMA, St. Louis, MO, U.S.A.) supplemented with 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 0.2% sodium bicarbonate, 50 μ M 2-mercaptoethanol (2-ME), 10 μ g/ml gentamicine sodium, and heat-inactivated 10% fetal bovine serum (FBS) (ICN Biomedicals, Inc., Arora, OH, U.S.A.) was used as a complete medium.

For preparation of mouse lymphocytes, spleen and lymph nodes were collected and kept on ice in complete medium. The spleen and lymph nodes were disrupted in the medium by pressing these tissues between two glass slides. The cell suspension thus prepared was filtered through a stainless mesh, and washed twice with the medium. Erythrocytes were lysed using ammonium chloride potassium carbonate lysis buffer. Human peripheral blood lymphocytes (PBL) were separated using Ficoll PaqueTM PLUS (Pharmacia Biotech Inc., Wikstroms,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Sweden) from blood provided by healthy donors. Viable nucleated cells were counted using a standard trypan blue (dye) exclusion assay system.

Establishment of mouse and human T cell lines

5 To prepare alloreactive T cell lines, B6 or 2C-tg mouse lymphocytes (5×10^7) were co-cultured with 30 Gy- irradiated (^{137}Cs ; Gammacell 40, Atomic Energy of Canada Limited, Ottawa, Canada) Balb/c lymphocytes (5×10^7) in RPMI 1640 complete medium (total volume: 10 ml) in a 50-ml flask (35-3014; FALCON, Beckton Dickinson Bioscience, Inc., Franklin Lake, NJ, U.S.A.) for six days. Following the addition of human IL-2 (10 ng/ml) (Immuno-
10 Biological Laboratories Co., Ltd, Fujioka, Japan), activated alloreactive T cells were stimulated with the irradiated Balb/c lymphocytes once a week. Since the T cell line obtained from B6 using this method consisted mostly CD8 T cells, in order to obtain CD4 T cell lines, CD8-depleted B6 lymphocytes were stimulated with the irradiated lymphocytes. To prepare CD8-depleted lymphocytes, newly isolated lymphocytes were incubated with an anti-mouse CD8
15 mAb (Lyt-2.2; Meiji, Tokyo, Japan) for 30 min at 4°C, and then with a Low-ToxTM-M Rabbit completent (Cedarlane, Ontario, Canada) for 50 min at 37°C. B6 or 2C-tg alloantigen-activated T cells stimulated three times or more were used as the murine T cell line.

To prepare human T cell lines, peripheral blood lymphocytes (5×10^6) provided by a healthy donor were co-cultured with 30 Gy-irradiated peripheral blood lymphocytes (5×10^6)
20 from a different healthy donor, in the presence of human IL-2 (10 ng/ml) in RPMI-1640 infection medium (1 ml) for seven days. After that, the lymphocytes were re-stimulated with the irradiated lymphocytes at least twice a week and were used as a T cell line.

Flow cytometry analysis

25 Collected murine cells were centrifuged, and incubated with the culture supernatant (50 μl) of anti-mouse CD16/32 mAb-producing hybridoma (2.4G2; American type culture collection, Manassas, VA, U.S.A) for 30 min at 4°C. This step was omitted for the human lymphocytes. Cells were washed in complete medium, incubated with various combinations of mAbs for 30 min at 4°C, and again washed twice with the complete medium. The biotinylated
30 mAb was detected with PE-streptavidin or PerCP streptavidin. Labelled cells were analyzed using a FACS Caliber with the CellQuest program (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), and the FLOWJO program (TREE STAR, Inc., San Carlos, CA, USA). In order to detect and eliminate dead cells, 125 ng of propidium iodide (PI) was added to the cell suspension (250 μl) right before cytometer application. This step was omitted in the separation of naive T cells from
35 human activated/memory T cells. EGFP was detected with fluorescence 1. In both murine and human studies, the $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+ \text{PI}^-$ cell population represents viable CD4 T cells and the CD3^+

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CD8⁺ PI⁻ cell population represents viable CD8 T cells. The CD8⁺ 1B2⁺ PI⁻ cells, which are transgenic clonotypic T cells, represent viable 2c T cells. Naive human T cells were determined to be those gated (sorted) as CD62L⁺ CD45RA⁺ CD3⁺ cells, and activated/memory human T cells as those excluded from CD3⁺ cells (Picker, L.J. *et al.*, J. Immunol., 1993, 150: 1105-1121; Ostrowski, M.A. *et al.*, J. Virol., 1999, 73: 6430-6435).

Gene delivery into murine or human T cells by SeV

To assess the gene transduction efficiency into activated or naive T cells, 200 µl of murine lymphocyte suspension (2×10^6 /ml) was cultured with SeV-EGFP (2.5×10^7 plaque forming unit (PFU)) for two days, in a 96-well flat-bottomed plate (3860-096; IWAKI, Tokyo, Japan) which was either non-coated or coated with the anti-mouse CD3 mAb (15 µg/ml) and the anti-mouse CD28 mAb (20 µg/ml). As for the human lymphocytes, 200 µl of the human peripheral blood lymphocyte (PBL) suspension (4×10^6 /ml) or the human T cell line (4×10^6 /ml) was cultured with SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU) for two days, in a 96-well flat-bottomed plate either non-coated or coated with the anti-human CD3 mAb (10 µg/ml) and the anti-human CD28 mAb (10 µg/ml). Assessment of gene transduction efficiency in alloactivated T cell lines was performed by co-culturing 100 µl of the B6 or 2C-tg mouse T cell line (2×10^6 /ml) with 100 µl of 30 Gy-irradiated B6 or Balb/c mouse lymphocytes (1×10^7 /ml) in the presence of SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU) for two days. Alternatively, this could be done by co-culturing 200 µl of the B6 or 2C-tg mouse T cell line (2×10^6 /ml) with SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU) in a 96-well flat-bottomed plate coated with antibodies (anti-CD3 antibody and anti-CD28 antibody) for two days. To assess the gene transduction efficiency under alloantigen-specific activation of naive T cells, fresh lymphocytes isolated from 2C-tg mouse were used. In an alternative experiment, 2.5 ml of a T cell line (2×10^6 /ml) from 2C-tg mouse was stimulated for six days with 2.5 ml of 30 Gy-irradiated lymphocytes (1×10^7 /ml) from B6 or Balb/c mouse (half of the medium was replaced with fresh medium every three or four days) in the presence of SeV-EGFP (6×10^8 PFU). The transduced T cells were washed with fresh medium, and re-stimulated with the irradiated B6 or Balb/c lymphocytes in the absence of SeV for six or seven days (restimulation was performed every six or seven days). To assess the effects of bystander activation, a mixed suspension of 50 µl 2C naive lymphocytes (1×10^7 /ml) and 50 µl B6 naive lymphocytes (1×10^7 /ml) was stimulated for two days with 100 µl of irradiated Balb/c, B6, or C3H lymphocytes (1×10^7 /ml), in the presence of SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU).

Each sample was cultured in triplicates at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. The EGFP expression level reached maximum 48 h after SeV infection. The appropriate concentration of activating mAb or optimal dose of SeV was determined by titration experiments. The lowest SeV dose for transducing the maximum EGFP into T cells was a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

multiplicity of infection (MOI) of 12.5, and SeV MOI over 500 had cytopathic effects on T cells.

Assessment of SeV entry into naive or activated T cells

5 B6 lymphocytes (4×10^6 /ml) were incubated in the presence or absence of SeV-luci (5×10^8 PFU/ml) inactivated with 2000 mJ UV (UV crosslinker; Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, CA, USA) at a 1:1 ratio for 30 min at 37°C. The cells were washed thoroughly with a complete medium, and incubated with SeV-EGFP (2.5×10^8 PFU/ml) at a 1:1 ratio for 30 min at 37°C. After three washes, 200 μ l of the cell suspension (2×10^6 /ml) was cultured for two
10 days in a 96-well flat-bottomed plate coated with the anti-mouse CD3 mAb (15 μ g/ml) and anti-mouse CD28 mAb (20 μ g/ml). Contaminant SeV present in the final washing medium had almost no ability to transduce EGFP into T cells that had not been pre-treated in the activating wells, and therefore this washing process was confirmed to be sufficient. For the positive control, prepared naive cells were cultured with SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU) in activating wells
15 for two days. To examine the release of attached SeV from naive T cells, 10 ml of B6 lymphocytes (2×10^6 /ml) were incubated in the presence or absence of SeV-EGFP (2×10^9 PFU) for 30 min at 4°C, washed thoroughly with the complete medium, and then incubated in the absence SeV for 0, 15, 30, 45, or 90 min at 37°C. After three washes, cells were cultured in activating wells at 37°C for two days. For the positive control, prepared naive cells were
20 cultured with SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU).

[Example 1] Recombinant SeV transduces EGFP into activated T cells with a high efficiency

Whether Sendai virus vectors can transduce EGFP gene into T cells was examined. First, murine lymphocytes were cultured with SeV-EGFP (MOI=62.5) for 48 h. While the ratio
25 of EGFP-positive cells in unstimulated murine CD3⁺ CD4⁺ or CD3⁺ CD8⁺ T cells (also referred to as CD4 T cells or CD8 T cells) was low (0.5 to 1.5% and 0.8 to 2.0%, respectively), CD3⁺ CD4⁺ or CD3⁺ CD8⁺ T cells non-specifically activated with the immobilized anti-CD3 antibody and anti-CD28 antibody expressed EGFP at high levels, and the ratio of EGFP-positive T cells dramatically increased (65 to 85% and 70 to 92%, respectively) (Fig. 1). In both cases of CD4
30 and CD8 T cells, the ratio of EGFP-positive cells increased in a SeV dose-dependent manner and nearly reached a plateau level at an MOI of 12.5.

Next, to examine whether it is possible to transduce genes into antigen-activated T cell lines, an alloantigen was used as a T cell-stimulating antigen, to which naive lymphocytes can respond and proliferate in primary cultures without *in vivo* immunization. The T cell line
35 generated by co-culturing unmodified lymphocytes from C57BL/6 and irradiated lymphocytes from Balb/c consisted mostly CD8 T cells. A CD4 T cell line was then obtained by co-culturing

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CD8 T cell-depleted lymphocytes with the irradiated stimulating lymphocytes. Alternatively, T cells from 2C-tg mouse (2C T cells) were used, which had a large quantity of naive T cell clones expressing L^d-specific TCR, and thereby enabled the observation of gene transduction in the antigen-specific response of primary T cells. As expected, T cells stimulated with an alloantigen were efficiently transduced with EGFP by SeV in the presence of irradiated allogeneic lymphocytes (Fig. 2). Further, even in the absence of stimulating allogeneic lymphocytes, activated T cells were efficiently transduced with the gene (Fig. 2). Although this effect was common in both CD4 and CD8 T cells, the EGFP expression level and EGFP-positive cell ratio tend to be slightly lower in the CD4 T cell line than CD8 T cell line. These findings suggest that SeV is able to transduce a target gene into T cells that are in an activated state.

T cells from 2C-tg mice were used to confirm the findings in antigen-specific T cell response. These 2C-tg murine T cells respond specifically to L^d and can be separated as a CD8⁺ 1B2⁺ population from bulk lymphocytes even in their naive state. EGFP was highly expressed in naive 2C T cells under the sole presence of allogeneic Balb/c stimulating cells, but was rarely expressed in the presence of syngeneic B6 stimulator cells. However, SeV efficiently transduced EGFP into activated 2C T cells that have been stimulated three times or more with Balb/c stimulator cells, in the presence of either B6 or Balb/c stimulator cells (Fig. 3). In addition, simple incubation of T cell lines with SeV for only 30 min at 37°C was sufficient for the maximum expression of EGFP (data not shown).

Further, since non-antigen specific T cells could be activated *in vitro* by the bystander effect of a strong alloresponse, the following experiment was performed to verify whether this powerful SeV gene transduction is limited to antigen-specific activated T cells. Naive 2C T cells were used as antigen-specific T cells that could respond to Balb/c stimulators but not to C3H stimulators. Responders (responding cells) comprising mixtures of C57BL/6 and naive 2C T cells were cocultured with or without Balb/c, C57BL/6, or C3H stimulator cells, followed by addition of SeV-EGFP (2.5×10^7 PFU) into the culture wells. With this culture system, whether EGFP gene was transduced into 2C T cells by SeV-EGFP could be examined when T cells from C57BL/6 mice were responding strongly to the C3H stimulators in the mixed lymphocyte culture. When C3H stimulator cells were used, even though C57BL/6 T cells responded to the C3H stimulators, EGFP was not transduced into 2C T cells. This same result was observed when no stimulator cells were used, and when C57BL/6 stimulator cells were used (Fig. 4). In contrast, when Balb/c stimulators was used, 2C T cells expressed EGFP at high levels (Fig. 4). Therefore, this gene transduction via SeV was limited to T cells activated with specific antigens.

[Example 2] Duration of transgene expression by SeV in activated T cells

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Next, *in vitro* maintenance of the transduced gene was examined. Activated 2C T cells were cocultured with the Sendai virus, and the transduced T cells were maintained *in vitro* with either Balb/c stimulators or C57BL/6 stimulators. EGFP expression level rapidly decreased following a peak expression at 48 h after the infection, but was maintained for at least 20 days (Fig. 5 and data not shown). EGFP expression level was not elevated, even with antigen re-stimulation using the Balb/c stimulators. These findings were observed also in the allospecific activated T cell lines (data not shown).

[Example 3] Gene delivery into activated human T cells and T cell lines

Freshly isolated human PBL from healthy donors were cultured with 2.5×10^7 PFU of SeV-EGFP expression vector (MOI=30) for 48 h. In contrast to murine T cells, although EGFP expression intensities were relatively low in unstimulated human $CD3^+ CD4^+$ and $CD3^+ CD8^+$ T cells, relatively high EGFP positive ratios were obtained (mean ratio = 23.1% in the range of 15 to 45%, and mean ratio = 34.0% in the range of 18 to 50%, respectively) (Fig. 6).

The present inventors hypothesized that the activated/memory T cell populations might be higher in human PBL than in mouse lymphoid tissues that had been maintained under specific-pathogen-free conditions. Naive T cells ($CD45RA^+ CD62L^+$) were separated from activated/memory T cells, and the EGFP expression of each T cell population was analyzed. As expected, the EGFP-positive activated/memory T cells had an exceptionally higher ratio of EGFP-positive cells than naive T cells which had a ratio below 4% (Fig. 7). Mouse studies showed that even in the absence of antigen stimulation, EGFP was efficiently transduced into T cells that had been preactivated with an antigen. Thus it was thought the activated T cells among the activated/memory phenotypic T cells were expressing EGFP. In contrast, the $CD3^+ CD4^+$ or $CD3^+ CD8^+$ T cells, which had been stimulated using the immobilized anti-CD3 antibody and anti-CD28 antibody, expressed EGFP intensely and had a high ratio of EGFP-positive cells (in the range of 30 to 69% and 50 to 70%, respectively) (Fig. 6).

In the human alloantigen-stimulated T cell line, both CD4 and CD8 T cells showed exceptionally efficient gene transduction, 97% and 98% respectively, in the presence of immobilized antibodies (Fig. 8). With this T cell line, simple incubation for only 30 min at 37°C was sufficient for the maximum EGFP expression.

[Example 4] Post-attachment entry of the SeV vector occurs in activated T cells but not in naive T cells

Possible mechanisms of the activated T cell-specific gene transduction mediated by SeV were examined. The following factors are likely to affect gene transduction efficiency: (i) SeV specific receptors (Markwell, M.A. and Paulson, J.C., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1980, 77:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5693-5697), (ii) putative co-receptors required for fusion (Kumar, M. *et al.*, J. Virol., 1997, 71: 6398-6406; Eguchi, A. *et al.*, J. Biol. Chem., 2000, 275: 17549-17555), and (iii) induction of signal transduction by T cell activation, which can affect SeV transcription after entry (Collins, P.L. *et al.*, Parainfluenza viruses. *In*: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields of virology. Vol. 2. Lippincott – Raven Publishers: Philadelphia, 1996: 1205-1241). Murine T cells were used in the investigation of these factors. SeV-mediated gene transduction was efficient in activated murine T lymphocytes, but was almost not seen with freshly isolated murine T lymphocytes. Therefore, in experiments using murine T cells, the procedure of separating naive T cells from activated/memory T cells was omitted.

10 In order to interfere with the T cell specific receptor and release sialic acid residues using the HN neuraminidase activity of SeV, freshly isolated lymphocytes were first incubated in the presence (pre-treated naive T cells) or absence (naive T cell without pretreatments) of UV-inactivated SeV-luci for 60 min at 37°C. These T cells were then incubated with SeV-EGFP (MOI=62.5) for 30 min at 37°C, and stimulated with the immobilized anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Two days later, EGFP expression levels were examined. In SeV-EGFP-pretreated naive T cells, the ratios of EGFP-positive cells in CD4 and CD28 T cells under continuous activation became 35% and 50%, respectively (Fig. 9). However, when naive T cells were incubated with UV-inactivated SeV-luci, transduction of the EGFP gene into activated T cells was inhibited. Most of the T cells that had been incubated with SeV-EGFP during the activation culture period expressed EGFP even if they were preincubated with inactivated SeV-luci, therefore the absence of EGFP expression in pretreated T cells was not due to decreased T cell viability (Fig. 9). Instead, this was thought to result from the recovery of SeV-specific receptors during the subsequent incubation period. Further, since the final washing medium transduced little EGFP into unmodified activated T cells (data not shown), the possibility of an insufficient washing process was eliminated. These findings suggest that SeV uses a specific receptor on T cells for gene transduction.

30 In a preliminary experiment that determined the T cell incubation time with SeV-EGFP, it was observed that the ratio of EGFP-positive T cells decreased with extended incubation time. From this observation, the present inventors hypothesized that SeV adheres to but does not fuse with naive T cells presumably because of co-receptor deficiency, which leads to the dissociation of SeV from naive T cells as a result of its own HN neuraminidase activity at the incubation temperature of 37°C, which is optimal for the enzyme's activity. Then, freshly isolated lymphocytes were incubated with SeV-EGFP (MOI=100) at 4°C, where neuraminidase hardly functions but SeV can still adhere to the sialic acid residues, followed by incubation in a fresh medium at 37°C for the indicated periods (Fig. 10). These T cells were then washed three times and stimulated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, and their GFP expression

THIS PAGE BLANK (USPTO)

levels were examined two days later. In this experiment, all T cells were equally activated in a way that data were not affected by factors such as cellular kinase activities associated with SeV gene expression, but only by factors associated with SeV entry. When T cells were incubated once at 4°C and then activated, ratios of EGFP-positive CD4 and CD28 T cells were 50% and 70% respectively. In contrast, a subsequent incubation at 37°C following 4°C, ratios of EGFP-positive cells decreased with time (Fig. 10). Ratios of EGFP-positive cells reached their minimum after 90 minutes of incubation at 37°C, and were equivalent to co-culturing T cells that had not been pretreated with SeV mixed in the culture medium after the final wash in activating wells. Positive control T cells incubated with SeV-EGFP during the culture period for activation were all transduced efficiently with the gene. Further, when activated T cells were used, the ratio of EGFP-positive T cells after only 30 min of incubation at 37°C was as high as that of the positive control (data not shown). Since SeV which has once entered naive T cells is not likely to be released therefrom, these phenomena can be interpreted as the ability of SeV to enter activated T cells, and to adhere to naive T cells but not fuse with them. It is highly possible that the vector particle causes internalization specific to activated T lymphocytes but not to naive T lymphocytes.

Industrial Applicability

The present invention enables efficient gene transduction into T cells. Since gene transduction into T cells is important for treating various diseases associated with the immune system, the present invention is expected to be applied in immunological modification strategies using T cell-directed gene delivery in these diseases.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CLAIMS

1. A method for transducing a gene into T cells, wherein said method comprises the step of contacting a paramyxovirus vector carrying the gene with activated T cells.
5
2. The method according to claim 1, wherein the paramyxovirus vector is a Sendai virus vector.
3. A method of preparing T cells transduced with a foreign gene, wherein said method comprises the step of contacting a paramyxovirus vector carrying said gene with activated T
10 cells.
4. The method according to claim 3, wherein the paramyxovirus vector is a Sendai virus vector.
5. A T cell transduced with a foreign gene prepared by the method according to claim 3 or 4.
15
6. A paramyxovirus vector to be used in gene transduction into activated T cells.
7. The vector according to claim 6, wherein the paramyxovirus vector is a Sendai virus vector.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ABSTRACT

The present invention provides methods of transducing a gene into activated T cells comprising the step of contacting a paramyxovirus vector with activated T cells. This invention also provides a method of preparing T cells transduced with a foreign gene comprising the step of contacting a paramyxovirus vector with activated T cells. This invention also provides T cells transduced with a foreign gene prepared by this method. The present invention enables efficient gene transduction specific to activated T cells, and is expected to be applied to immunological modification strategies using T cell-directed gene delivery.

ORIGINAL TEXT FILE

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)